ARCHIVES ROUMAINES
DE
PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE
MICROBIOLOGIE

ARCHIVES ROUMAINES

DE

PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE

ET DE

MICROBIOLOGIE

Publiées sous la Direction de

J. CANTACUZÈNE

Professeur à la Faculté de Médecine de Bucarest

Tome I — 1928

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain, PARIS (VIe)

AVANT-PROPOS

Dès les temps héroïques de la microbiologie, après que Pasteur et Koch eurent publié leurs mémorables travaux, on compte des savants roumains parmi les adeptes de la nouvelle science.

En 1886, Victor Babès, appelé à la chaire d'anatomie pathologique et de bactériologie de la Faculté de médecine de Bucarest, institua l'enseignement de la bactériologie et se distingua par d'importantes découvertes. A son école appartiennent Marinesco, Puscariu, Sion, Proca, Riegler, Levaditi, dont les noms sont connus à cause des travaux qu'ils ont faits.

Jean Cantacuzène, qui, par un long séjour à l'Institut Pasteur, s'était initié aux méthodes pastoriennes et qui avait participé aux recherches sur l'immunité, fonda en 1901, à Bucarest, une Ecole de médecine expérimentale et de bactériologie, sur le modèle de l'Institut Pasteur de Paris. Il groupa autour de lui une pléiade de jeunes travailleurs : Al. Slatineano, S. Irimesco, Ionesco-Mihaiesti, les frères Michel et Alexandre Ciuca, C. Goresco, D. Danielopolu, I. Balteano, D. Combiesco, I. Nicolau, V. Baroni, P. Condréa, M. Nasta, Al. Tupa, V. Panaitesco, M. Marbé, etc..., qui constituent un groupe scientifique qui fait honneur à la Roumanie et au maître qui l'a formé. Nombreuses sont les publications de ces savants qui ont enrichi les périodiques des divers pays, notamment les périodiques français. A cette phalange de travail-

leurs pleins d'ardeur et d'originalité, un organe indépendant était nécessaire : il paraît sous le nom d'*Archives Roumaines de Pathologie expérimentale et de Microbiologie*. Il suffit de parcourir le premier fascicule pour juger de l'intérêt de la nouvelle publication, que tout biologiste tiendra à avoir sous la main. C'est un plaisir pour moi de souhaiter à ces *Archives* la prospérité que mérite la valeur des travaux qu'elles nous apportent et de dire mon estime et mon amitié pour celui qui les dirige.

Dr Roux.

Paris, novembre 1927.

ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME I *N° 1* *JANVIER 1928*

MÉMOIRES ORIGINAUX

RECHERCHES SUR LES RÉACTIONS D'IMMUNITÉ CHEZ LES INVERTÉBRÉS

Premier Mémoire

Réactions d'immunité chez *Sipunculus Nudus*

par

J. CANTACUZÈNE

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Le travail qui va suivre est le résultat de recherches poursuivies pendant plusieurs campagnes d'été à la station biologique de Roscoff. En le publiant, je veux apporter, une fois de plus, à la mémoire d'Yves Delage, l'hommage d'affection et de gratitude que je dois à ce maître ; cette étude, entreprise de son vivant, avait suscité son intérêt, et je ne saurais oublier les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer au cours de mes expériences. Je tiens aussi à adresser au professeur Perez mes plus vifs remerciements pour l'accueil plein d'amitié que j'ai reçu de lui dans ce laboratoire de Roscoff, où il est si difficile de ne plus revenir une fois que l'on y a goûté la joie de travailler en

pleine liberté, dans une atmosphère imprégnée du plus rare esprit de camaraderie scientifique.

Le *Sipunculus Nudus,* sur lequel ont porté mes recherches, constitue pour l'étude des réactions d'immunité un objet particulièrement favorable. Les raisons qui nous l'ont fait choisir sont surtout les suivantes :

1° Ces animaux avalent du sable dont leur intestin est constamment bourré ; ce sable, riche en minuscules grains de quartz à arêtes coupantes, détermine fréquemment sur la paroi intestinale des lésions à la faveur desquelles ces grains parviennent dans la cavité générale. Nous n'en voulons pour preuve que les corps bruns, si nombreux chez certains individus, et qui contiennent bien souvent des petits fragments de quartz enrobés dans leur masse : ces fragments ne peuvent avoir d'autre origine que l'intestin. Il y a donc là une cause permanente d'infection du liquide cavitaire contre lequel l'animal doit être prémuni par un puissant appareil de défense.

2° Les urnes mobiles qui peuplent le liquide cavitaire, et dont le rôle agglutinant a été décrit par Cuénot, représentent des éléments d'un haut intérêt ; ils contribuent à la défense de l'organisme grâce à un mécanisme fort complexe, très imparfaitement élucidé et dont la connaissance est des plus suggestives ; elle peut, en effet, servir d'introduction à l'étude de ces éléments (ou de ces organes) agglutinogènes, dont l'importance dans la série animale semble être infiniment plus considérable qu'on ne se l'était figuré jusqu'ici, et sur lesquels nous ne possédons encore que des notions à peine entrevues (telles sont, par exemple, les plaquettes sanguines des mammifères).

3° Condition très favorable pour l'étude du sang (1) : la grande taille des siponcles permet de recueillir ce liquide aseptiquement et en quantités considérables ; le sang peut être conservé *in vitro* un grand nombre d'heures sans que la vie des cellules soit atteinte d'une façon appréciable ; les urnes, les amibocytes, les vésicules énigmatiques continuent à y remplir pendant assez longtemps leurs fonctions tout comme à l'état normal. On comprend sans peine tout l'avantage qu'il y a à pouvoir contrôler et préciser pas à pas, *in vitro* (tout en faisant varier à volonté les conditions de l'expérience), les réactions constatées chez l'animal vivant. D'autre part, le sang de ces animaux ne se coagule pas ; mais la

(1) Nous appliquons indifféremment au même liquide le nom de sang ou de liquide cavitaire.

formation de coagula ou conglomérats complexes, de composition purement cellulaire, s'y manifeste énergiquement et semble liée chez ces êtres, avec plus d'évidence peut-être que chez d'autres espèces, aux processus défensifs : il y a là, on le voit, un ensemble de circonstances des plus favorables pour l'analyse des réactions cellulaires ou humorales qui interviennent dans la défense de l'organisme contre les infections.

4° En prenant quelques précautions que nous indiquerons dans le chapitre suivant, *Sipunculus Nudus* peut être entretenu en bon état et pendant un temps très long dans les bacs à eau courante de l'aquarium ; nous en avons conservé de la sorte pendant plus de deux ans, et il n'est pas douteux que ce temps ne puisse être prolongé, puisque M. Hérubel a pu les faire vivre au laboratoire, en parfaite santé, pendant plus de trois ans.

5° Enfin, contrairement à ce qui se produit pour les Phascolosomes, le *Sipunculus Nudus* supporte bien les inoculations expérimentales ; il est facile, en employant la technique que nous décrirons plus loin, d'inoculer à ces animaux toutes espèces d'émulsions ou de suspensions d'organes broyés. On peut répéter un grand nombre de fois ces inoculations chez le même individu sans produire d'hémorragie appréciable et sans avoir à constater de mortalité excessive. Pour toutes ces raisons, auxquelles il faut ajouter la simplicité relative de son organisation qui le rend très maniable, le *Sipunculus Nudus* offre à l'expérimentateur des avantages de premier ordre. Nous n'avons pas eu à nous repentir de l'avoir choisi comme sujet de recherches.

Le liquide cavitaire des Sipunculides a dès longtemps attiré la curiosité des observateurs et suscité des recherches qui nous ont apporté une notable moisson de faits et d'hypothèses touchant la morphologie et le fonctionnement des éléments figurés contenus dans ce liquide. La présence, exceptionnelle chez les invertébrés, d'érythrocytes porteurs d'un pigment respiratoire ; l'existence de ces vésicules énigmatiques signalées par Cuénot chez *Phascolosoma vulgare,* et retrouvées plus tard chez les Siponcles, mais surtout la présence des urnes mobiles de *Sipunculus Nudus,* dont la signification, la structure et la nature ont donné lieu à tant de controverses : tout contribue à conférer à ce liquide un caractère très spécial et à provoquer les recherches.

Voici maintenant, très brièvement résumées, les étapes principales, par lesquelles a passé l'étude du sang chez *Sipunculus Nudus.*

Dès 1850, de Quatrefages avait signalé l'existence d'hématies

chez les sipunculides, découverte confirmée plus tard par bien des observateurs, et tout d'abord par Ray Lankester et par Jourdan (1880-1883), puis par Vignal (1886). Ces constatations furent complétées plus tard par Métalnikov qui, en 1898, décrivit le noyau de ces éléments et signala dans leur cytoplasma des vacuoles colorables au rouge neutre ; Cuénot (1900) décrivit, chez *Phascolosoma vulgare,* des grains pigmentaires animés d'un mouvement brownien chez les érythrocytes jeunes, immobiles chez les cellules âgées ; ces corpuscules furent retrouvées par maints auteurs chez *Sipunculus Nudus* ; Kollmann signale leur multiplication dans les hématies en voie de division. On discute encore sur leur signification. Schwalbe, en 1869, avait déjà signalé la présence d'un pigment respiratoire dans le sang des sipunculides. Ce pigment, fixé sur les érythrocytes, fut étudié par Krukenberg en 1882 et désigné par lui sous le nom d'hémérythrine. Griffiths montre, en 1892, que le fer est le métal catalyseur associé à ce pigment, qui contient également des quantités notables de soufre. L'hémérythrine des hématies diffuse dans l'eau distillée ou les solutions salines de faible concentration (Bottazzi) ; elle ne présente pas de bandes d'adsorption dans le spectre (Velichi). Les hématies se multiplient dans le sang par division directe (Metalnikov, Kollmann). Leur origine est encore incertaine. Elles prennent naissance, d'après Metalnikov, dans un organe hématopoïétique situé sur l'un des tubes de Poli ; d'après Hérubel, elles dérivent directement de l'endothélium de ces tubes. En 1913, Cuénot soutint que les érythrocytes, à côté de leur rôle dans l'hématose, possèdent également une fonction excrétrice : ils absorbent, en effet, dans leurs vacuoles le carmin soluble et le bleu de méthylène.

Les amibocytes des siponculides ont été signalés par tous ceux qui se sont occupés du sang de ces animaux. Mais le premier travail ayant apporté sur cette question des notions précises est celui de Cuénot (1891). Ce savant avait dès alors distingué des amibocytes à fines granulations et d'autres bourrées de grosses sphérules albuminoïdes ; dans un travail postérieur (1900), il étudia les réactions colorantes de ces granulations ; il classa les granulations fines dans la catégorie des acidophiles et les grosses sphérules dans le groupe des inclusions neutrophiles ; il admit d'ailleurs que la seconde catégorie d'amibocytes dérive de la première. Le problème fut repris plus tard (1908) par Kollmann, qui, aux deux groupes de Cuénot, en ajouta un troisième : celui des amibocytes hyalins, dépourvus de granula-

tions colorables par les colorants acides ou basiques ; pour cet auteur, les granulations fines sont des amphophiles tendant plutôt vers l'acidophilie; il en serait de même des grosses granulations sphérulaires. Le lieu d'origine des amibocytes a été passablement discuté et n'est pas encore bien établi ; la glande lymphogène, dans les mailles de laquelle se formeraient les amibocytes jeunes, est située, d'après Kollmann, sur la paroi externe du tube dorsal de l'appareil tentaculaire (appareil de Poli). Mais le rôle de cette glande ne lui semble pas suffisamment clair. Il est assez curieux de constater à quel point les observateurs, à part Cuénot, ont peu insisté sur les fonctions phagocytaires des amibocytes chez *Sipunculus Nudus*. A côté du pouvoir phagocytaire dont ils sont doués, Cuénot leur attribue une fonction excrétrice comparable à celle des chloragogènes et dont le produit est représenté par des granules jaunes, de nature chimique inconnue, ne contenant pas d'acide urique.

Selon Cuénot, les urnes auraient été découvertes par Krohn, qui les considéra comme des parasites. Keferstein et Ehlers (1861-1865) affirmèrent qu'il s'agit là, au contraire, d'éléments faisant partie intégrante de l'organisme des siponcles. Brandt, en 1871, leur assigna comme fonction celle de brasser le sang et de remplacer ainsi l'organe circulatoire contractile absent. Dès 1891, Cuénot avait signalé le rôle agglutinant des urnes. Dans un travail publié en 1902, et dans lequel il eut le grand mérite de formuler la notion nouvelle d'éléments à fonction agglutinogène, ce savant apporta sur le rôle de ces éléments si particuliers toute une série d'observations des plus intéressantes. Mélangeant *in vitro* du carmin, de l'encre de Chine, du bleu de Prusse ou des bactéries avec le liquide cœlomique de *Sipunculus Nudus*, il montra le pouvoir agglutinant des urnes ; les particules amenées à leur contact, grâce au jeu des cils, y sont agglutinées probablement par une substance visqueuse sécrétée par elles. Ce pouvoir agglutinant présente un certain caractère de spécificité et ne s'adresse pas indifféremment à toutes les particules en suspension dans le liquide cavitaire : les éléments propres du sang y échappent ; tant qu'ils ne sont pas altérés, ils ne sont pas attirés dans le tourbillon ciliaire. Les urnes ne possèdent aucun pouvoir phagocytaire. La charge de particules étrangères qu'elles traînent derrière elles finit par tomber et par se transformer en corps bruns. Le pouvoir agglutinant a pour conséquence de débarrasser le liquide cavitaire des particules étrangères qui l'encombrent. A part leur rôle agglutinogène, les urnes ont éga-

lement celui de brasser énergiquement le liquide cavitaire et, en empêchant la stagnation des érythrocytes, dont le poids spécifique est très considérable, d'assurer l'hématose.

Telle est l'importante contribution apportée par Cuénot à l'étude fonctionnelle des urnes, qu'il considère d'ailleurs comme étant des éléments appartenant en propre à l'organisme. Elle fut complétée en 1902 et 1907 par Hérubel ; la nature unicellulaire de l'urne chez les siponcles, niée par différents auteurs, a été nettement démontrée par lui. Aux faits reconnus par les auteurs précédents, Selensky (1907-1908) ajoute une notion nouvelle : c'est que les urnes peuvent manquer complètement chez 2 % des siponcles ; il est vrai que, dans ce cas, on constate souvent dans le liquide cavitaire la présence de débris d'urnes dégénérées. Nous verrons au cours de ce travail l'importance de cette observation au point de vue pathologique. Buytendyck (1909), après avoir insisté sur la sécrétion, par l'urne, d'une substance agglutinante à réaction alcaline, fait la curieuse observation que les particules provenant de corps bruns écrasés sont agglutinées par les urnes avec infiniment plus d'énergie que n'importe quelles autres particules venues au contact de ces éléments. De même des particules de carmin ou d'encre de Chine recueillies dans le liquide cavitaire d'individus ayant subi antérieurement plusieurs injections faites au moyen de ces différentes poudres, sont agglutinées par les urnes d'individus « neufs » avec beaucoup plus d'énergie que des poudres fraîches n'ayant pas subi l'imprégnation d'animaux « immunisés ».

La théorie parasitaire des urnes, émise par Krohn et soutenue plus tard par Vogt et Yung, puis par Kunstler et Gruvel, ne compte plus de défenseurs depuis bien longtemps. Quant à l'origine histogénétique des urnes chez *Sipunculus Nudus,* elle est encore insuffisamment élucidée à l'heure actuelle ; les canaux de Poli seraient le lieu où ces éléments prennent naissance selon Metalnikov, Ladreyt et Hérubel, qui d'ailleurs ne sont pas d'accord sur le point exact des canaux où cette formation aurait lieu.

Les vésicules énigmatiques ont été découvertes en 1900 chez *Phascolosoma vulgare* par Cuénot, qui signala, à côté des grandes formes à plusieurs noyaux, les formes jeunes à un et deux noyaux. Metalnikov les signala, la même année, chez *Sipunculus Nudus.* Hérubel, en 1907, a émis l'idée que ces éléments auraient une fonction agglutinogène et joueraient un rôle dans la formation des corps bruns.

A part un certain nombre de données éparses sur le rôle agglu-

tinant des urnes et le pouvoir phagocytaire des amibocytes, les réactions d'immunité n'avaient pas été méthodiquement étudiées chez le siponcle jusqu'aux recherches entreprises par J. Cantacuzène sur ce sujet. Les phases successives de l'infection expérimentale et de la défense chez les individus normaux et immunisés, le mécanisme de l'agglutination, par les urnes, des particules étrangères, le rôle que jouent les facteurs électrostatiques dans ce mécanisme, l'intensification des phénomènes réactionnels normaux chez les animaux immunisés et en même temps l'apparition dans le plasma de ces derniers de propriétés humorales nouvelles : ces divers processus ont été étudiés dans une série de notes et mémoires publiés en 1922 et 1923 (dont deux en collaboration avec F. Vlès). Je n'insiste pas sur le détail de ces recherches, dont l'exposé doit faire l'objet du présent travail.

En ce qui concerne les caractères physico-chimiques du plasma des siponcles, les faits connus se réduisent à assez peu de chose. Quelques renseignements sur le point de congélation, la viscosité, la tension superficielle et la conductibilité électrique sont dus à F. Bottazzi. Quant à la composition chimique, nous savons par Vignal (1886) que le plasma renferme des traces d'une protéine précipitable par l'alcool. Cette protéine a été constatée également par Cuénot ; avec F. Vlès, nous avons montré qu'elle floculait rapidement à la cathode, de même que les hématies et les urnes. M^lle^ A. Damboviceanu a publié (1926) d'intéressantes recherches sur la détermination et les modifications des constituants physico-chimiques du plasma des siponcles, à l'état normal et au cours de l'immunisation. Cet auteur, entre autres choses, nous a montré que les protéines coagulables par la chaleur qui se trouvent dans le plasma normal à l'état de traces (0.50 ‰) augmentent considérablement chez les animaux immunisés au point de dépasser de sept fois (3,75 ‰) la teneur normale. Dans un travail fait avec Rapkine (1925), M^lle^ A. Damboviceanu, étudiant le pH intracellulaire de ces animaux, a pu constater que ce pH qui, chez les urnes et les vésicules énigmatiques à l'état normal (pH = 7,4), est sensiblement égal à celui du plasma ambiant (pH = 7,6), tend, chez les individus immunisés, vers une acidité prononcée atteignant 6,1 dans les vésicules, 5,7 dans les urnes. Quant à la sécrétion muqueuse des urnes, elle est franchement acide à l'état normal (contrairement à l'opinion émise par Buytendyck) et augmente considérablement d'acidité chez les immunisés (jusqu'à pH = 5).

Nous possédons bien peu de travaux sur les phénomènes de

coagulation chez les siponculides. Et cependant ces phénomènes existent. Il est vrai qu'il n'y a pas chez eux de coagulation du plasma ; Nolf a noté l'absence dans ce liquide d'une thrombine capable de faire coaguler une solution de fibrinogène de mammifères ; on a décrit néanmoins la formation de flocons d'amibocytes agglutinés en petits amas avec tendance à la précipitation, et aussi celles de réseaux flottants dans le liquide, également d'origine amibocytaire (Velichi, 1900; Ducceschi, 1902). Nous verrons dans le cours de ce travail l'importance qu'il convient d'attribuer, au point de vue des processus défensifs, à la formation de coagula cellulaires. Depuis nos dernières publications, nous avons précisé et étendu nos recherches sur les processus d'infection, d'intoxication et d'immunisation chez *Sipunculus Nudus*. La formation de conglomérats cellulaires, le rôle que jouent les vésicules énigmatiques dans leur genèse, la mithridatisation, ou immunité acquise par certaines cellules défensives aux poisons solubles, ont particulièrement fixé notre attention. Le présent travail a pour objet une étude sur l'ensemble des résultats acquis par nous sur cette question ; nous nous efforçons d'y exposer, en un tableau aussi fidèle que possible, ce que nous savons aujourd'hui relativement au mécanisme par lequel les siponcles réagissent aux agents pathogènes ou aux corps étrangers en général. Au cours de nos recherches, nous avons eu l'occasion de récolter maintes observations et de préciser certains points relatifs à la morphologie des cellules sanguines. Nous ne pensons pas nous éloigner trop de notre sujet en notant chemin faisant les faits acquis de la sorte. Nous ne nous dissimulons pas, à la vérité, à quel point ce travail demeure incomplet ; les lacunes y abondent ; les points restés obscurs s'y rencontrent à chaque instant. Tel qu'il est, il peut servir de point de départ à de nouvelles recherches et, peut-être, suggérer certains points de vue assez inattendus aux chercheurs qui limitent trop exclusivement leurs efforts à l'étude complexe des réactions d'immunité chez les vertébrés supérieurs. Il serait désirable que le nombre des recherches expérimentales sur les réactions défensives chez les invertébrés allassent en se multipliant : nos connaissances sur le problème général de l'immunité ne sauraient qu'y gagner.

CHAPITRE II

MÉTHODES ET INDICATIONS TECHNIQUES. INFECTIONS SPONTANÉES CHEZ SIPUNCULUS NUDUS.

a) **Habitat, récolte des animaux, entretien dans l'aquarium.** — Le *Sipunculus Nudus* ne se rencontre que tout à fait exceptionnellement dans la région avoisinant immédiatement Roscoff. On le trouve au contraire en abondance sur la plage de Locquémeau, petit port situé à l'embouchure de la rivière de Lannion, en face Trébeurden. Pour retrouver des gîtes à *Sipunculus Nudus* sur la côte armoricaine, il faut pousser jusqu'à l'anse de Bertheaume, à Camaret ou à Morgat. C'est de Locquémeau que provenaient tous les individus qui ont servi à nos études : il y a là une grève de sable granitique fin très pur dans lequel ces animaux vivent enfouis à une profondeur de 30 à 40 centimètres, à l'intérieur de galeries creusées parallèlement à la surface. Rien à l'extérieur ne trahit leur présence à marée basse ; « comme tous les êtres arénicoles, dit Hérubel dans la monographie qu'il a consacrée aux siponculides, les siponcles se tiennent cachés pendant la basse mer. Avec le flux, ils sortent leurs tentacules, qui viennent s'épanouir à la surface du sol marin. »

Le *Sipunculus Nudus* est facile à entretenir en captivité, à la condition d'observer quelques précautions. D'abord il est essentiel de ne déposer dans les bacs de l'aquarium que des exemplaires parfaitement intacts. Il arrive assez souvent, en effet, qu'à l'occasion de sa capture l'animal ait été blessé légèrement par la bêche qui sert aux fouilles ou par les doigts qui achèvent de le dégager du sable. Etant donné la tension considérable du liquide cœlomique, ainsi que les alternatives de pression et de décompression que ce liquide exerce sur les parois du corps à l'occasion des mouvements d'extension et de rétraction de l'introvert, une érosion légère de l'épiderme ne tarde pas à se transformer en déchirure plus vaste ; la paroi musculaire herniée cède bientôt, et il se produit une hémorragie souvent très considérable. Alors même que celle-ci ne serait pas par elle-même mortelle, le liquide cœlomique, dépouillé par la perte du sang d'une bonne partie de ses cellules défensives, s'infecte et l'animal succombe à une septicémie. En conséquence, il importe de rejeter impitoyablement tout individu porteur d'une blessure, même minime, du tégument externe.

Il arrive parfois que l'animal, ainsi infecté, résiste par ses propres moyens et entre en convalescence. A ce moment, il est à peu près privé d'urnes et de phagocytes, qui ne tardent pas d'ailleurs à se reconstituer ; il se trouve en état de moindre résistance et est incapable de supporter une inoculation expérimentale qui serait inoffensive pour un sujet sain. Il y a là une cause de déboires ou même d'erreurs qu'il est facile d'écarter grâce à un minutieux triage effectué après la récolte.

Les animaux doivent être maintenus dans un bac à eau courante constamment renouvelée, garni d'une épaisseur de sable fin de 20 à 25 centimètres. Il est très important, si l'on veut les faire vivre longtemps, de garantir le bac contre l'action directe de la lumière et de le maintenir dans une obscurité relative. J'ai, à plusieurs reprises, pu me rendre compte à quel point cette précaution était utile, surtout lorsqu'il s'agit de siponcles inoculés expérimentalement. C'est d'ailleurs là une mesure nécessaire à l'entretien, en captivité, de bien des espèces d'animaux marins qui mènent une vie sédentaire : les grandes ascidies, par exemple. J'ai réussi de la sorte à faire vivre des siponcles en parfaite santé pendant plus de deux ans : un accident survenu dans mon élevage (arrêt de courant d'eau ayant causé la mort de tous les siponcles) m'a seul empêché de poursuivre les expériences plus loin. Il faut se garder d'introduire dans les bacs où vivent les siponcles certains animaux qui en sont très friands, en particulier *Sagartia Parasitica,* ou certains crustacés décapodes *(Carcinus Mœnas, Pagurus Bernardus)*. Je n'ai pas observé que le voisinage de *Maia Squinado* fût dangereux. D'après Hérubel, les céphalopodes (seiches et poulpes) ne touchent point aux siponcles. Les poissons également doivent être écartés.

Les siponcles se nourrissent au moyen de particules alimentaires extraites du sable ou de l'eau qu'ils avalent ; il est inutile de leur fournir dans les bacs une alimentation supplémentaire.

b) **Inoculations expérimentales. Saignée. Infections spontanées des siponcles.** — Il est très facile de pratiquer chez *Sipunculus Nudus* des inoculations dans le cœlome. On doit se servir pour cela d'une aiguille de seringue d'un calibre aussi petit que possible, afin d'éviter les hémorragies. Le lieu où se fait la ponction n'est pas indifférent. Il existe, au pôle postérieur de l'animal, une dépression linéaire de 1 millimètre de longueur environ, limitée par deux petits replis du tégument, et correspondant à l'insertion du muscle fusiforme ou muscle de la spire intestinale. En

ce point, et en ce point seul, la couche des muscles circulaires de la paroi, enserrant l'extrême pointe du corps, forment en se contractant un véritable sphincter qui s'oppose à la sortie du sang quand le tégument a été lésé. C'est là le point d'élection pour piquer l'animal sans danger, l'unique : toute autre région de la surface tégumentaire est inutilisable ; partout ailleurs, en effet, l'orifice produit par l'aiguille ne se referme pas, le liquide cœlomique s'en échappe en jet que ne font qu'intensifier les contractions de la paroi. Pour pratiquer l'injection, il faut, saisissant le siponcle de la main gauche, piquer entre les deux lèvres de la petite invagination. La paroi en ce point est tellement mince, qu'il est à peine besoin d'appuyer. L'aiguille une fois entrée dans le cœlome, éviter d'avancer trop loin, crainte de léser l'intestin. On retire l'aiguille lentement : l'hémorragie est nulle ou absolument minime.

C'est au niveau de ce même point qu'il convient de saigner l'animal ; cette saignée se pratique au moyen d'une pipette Pasteur stérile, d'assez fort calibre, moyennement effilée, et que l'on fait pénétrer dans le cœlome au point d'élection. En vertu de sa pression, le sang monte rapidement dans la pipette ; il est aisé, en s'y reprenant plusieurs fois de suite, de saigner l'animal à blanc. Ne pas employer de pipettes trop effilées : elles s'obstrueraient trop facilement, surtout pendant la seconde phase de l'opération, alors que les corps bruns cantonnés dans la portion antérieure du cœlome viennent se présenter à l'orifice de la pipette. On recueille le sang ainsi obtenu dans un ou plusieurs tubes à essai stériles. Un gros siponcle peut fournir jusqu'à 20 centimètres cubes de liquide cavitaire et même davantage.

La saignée peut s'effectuer stérilement, ce qui est indispensable lorsque l'on veut pratiquer les ensemencements avec le liquide cœlomique. Dans ce but, l'on commence par sécher avec du papier filtre la surface de l'animal ; puis, le tenant à pleine main de la main gauche, on lave soigneusement le pôle postérieur avec de la ouate imbibée d'alcool absolu ; après dessication, on flambe cette extrémité à la flamme d'une lampe à alcool, tout comme s'il s'agissait d'un tube à essai, en ayant soin toutefois de ne pas trop insister, sinon la chaleur pourrait faire éclater le tégument. On ponctionne alors avec une pipette préalablement flambée et l'on ensemence selon la technique classique.

Nous avons généralement pratiqué nos isolements sur de la gélose peptonée ordinaire. Le développement des cultures se fait à la température du laboratoire. La grande richesse du liquide

en éléments cellulaires gêne et retarde souvent l'apparition des premières colonies (couche cellulaire isolante à la surface de la gélose ; action bactéricide des produits d'autolyse cellulaire, etc., etc.). Il faut souvent attendre plusieurs jours avant d'obtenir un résultat positif et faire un repiquage en cas d'insuccès. Il est bien rare de rencontrer un liquide cavitaire complètement stérile ; on peut dire qu'il contient toujours des bactéries en petit nombre ; elles sont très probablement d'origine intestinale. Leur présence, qui met en jeu sans relâche l'activité agglutinante des urnes, explique pourquoi la plupart de ces éléments portent, à l'état normal, un petit bouquet d'amibocytes adhérent à leur pôle postérieur. Il est juste d'ajouter que l'infection n'est probablement pas la cause unique de l'accolement aux urnes des phagocytes cœlomiques. Ces bactéries semblent d'ailleurs peu variées comme espèces. Celle que l'on rencontre le plus souvent est un petit bâtonnet très mobile à type vibrionien, dont nous donnons plus loin une description sommaire et qui nous a servi comme antigène dans plusieurs de nos expériences.

Les inoculations expérimentales sont généralement bien supportées et peuvent être réitérées facilement chez le même individu. Il faut éviter cependant de les répéter à des intervalles trop rapprochés, intervalles qui doivent varier nécessairement avec la dose et la toxicité de l'antigène employé. Nous verrons, au cours de ce travail, que l'introduction dans le cœlome de bactéries ou même de corps étrangers quelconques a pour conséquence l'épuisement et la destruction en masse des urnes et des amibocytes. Après ces efforts, l'organisme, en partie dépouillé de ces éléments de défense, se trouve désarmé vis-à-vis d'une réinfection. Il y a là un exemple des plus nets de cette « phase négative » tant discutée chez les vertébrés supérieurs au cours de l'immunisation et qui apparaît ici avec une évidence quasi schématique. Une réinoculation trop hâtive risque de tuer l'animal, et il faut donner aux cellules défensives le temps de se reconstituer.

Nous citerons à l'appui de ce que nous venons de dire l'exemple très démonstratif des accidents qui peuvent survenir au cours de l'immunisation des siponcles contre les poisons de l'*Adamsia Palliata*. On prépare dans ce but une émulsion d'aconties finement broyées et mises en suspension dans l'eau de mer. L'émulsion doit être filtrée sur papier Chardin. Les paquets d'aconties contiennent toujours un certain nombre de bactéries déposées à la surface externe de l'actinie et que l'on inocule forcément en même temps que l'émulsion. La première injection est tou-

jours bien supportée si la dose n'a pas été trop forte ; elle s'accompagne d'une destruction notable des cellules sanguines, très sensibles à l'action toxique du poison des nématocystes ; cette destruction s'accentue à l'occasion d'une seconde injection faite à l'intervalle de peu de jours. Jusqu'ici, l'animal a résisté sans que les bactéries introduites dans le sang aient pu s'y multiplier. A ce moment, le liquide cœlomique est en très grande partie dépouillé de ses cellules défensives : les urnes ont diminué considérablement en nombre et sont peu actives ; très réduits en nombre également les phagocytes libres, engagés pour la plupart dans les ballots amybocytaires, résidus des inoculations précédentes ; les vésicules énigmatiques sont rares et dépourvues d'éléments cristalloïdes ; l'anémie est prononcée et les hématies, réduites elles aussi en nombre, présentent un état d'anisocytose accentuée. Dans ces conditions, une troisième inoculation faite à un intervalle trop rapproché, sans que l'on ait laissé aux cellules sanguines un temps suffisant pour se reconstituer, s'accompagne presque fatalement d'une pullulation rapide des bactéries présentes dans l'émulsion. Si l'on suit le processus infectieux, l'on constate ceci : les rares urnes restantes fixent à leur pôle postérieur des paquets de bactéries, mais sont incapables d'en débarrasser complètement le liquide cœlomique. Aucun phagocyte ne pénètre dans les amas agglutinés ; les amibocytes libres n'englobent aucune bactérie et la phagocytose est nulle, bien que ces bactéries viennent adhérer en grand nombre à la surface des amibocytes plus ou moins dégénérés et s'y disposer radiairement, en franges (leur extrémité libre restant animée de rapides mouvements, tandis que l'autre extrémité reste fixée à l'exoplasme cellulaire). Dans ces conditions, l'animal ne tarde pas à succomber.

Un autre exemple du danger qu'il y a à inoculer des siponcles éprouvés par une maladie antérieure est le suivant. Il existe chez les siponcles, du moins chez ceux maintenus en captivité, des infections spontanées. L'une d'elles, dont nous avons observé, pendant l'une de nos campagnes d'été, un certain nombre de cas dans nos bacs, peut être désignée sous le nom de « maladie bulleuse ». Elle se manifeste, en effet, extérieurement par la présence de bulles épidermiques, d'aspect pemphigoïde, claires, tendues, variant de la taille d'un grain de riz à celle d'un pois, remplies de liquide et disséminées à la surface du tégument. Lorsque ces bulles viennent à crever, elles laissent à leur place une ulcération qui persiste jusqu'à la mort de l'animal, mais

qui peut également guérir : dans ce dernier cas, il reste en ce point une tache cicatricielle, plus ou moins pigmentée, qu'il n'est pas très rare de rencontrer chez des siponcles sains. Tous les individus, en effet, ne meurent pas à la suite de cette affection ; beaucoup guérissent spontanément, mais gardent pendant longtemps un état d'anémie prononcée. Si l'on examine le contenu des bulles, on y trouve en abondance une petite bactérie très mobile ; le liquide est envahi par les amibocytes émigrés de la cavité générale ; dans les cas à issue favorable se produit une énergique réaction phagocytaire. Jamais je n'ai vu pénétrer dans ces bulles d'urnes ou de vésicules énigmatiques. A ce moment, le liquide blanchâtre est absolument homologable au pus d'un furoncle chez un vertébré. Quand la bulle crève, les phagocytes achèvent de nettoyer la surface ulcérée, processus très facile à suivre sur des frottis. Dans les cas mortels, la réaction phagocytaire est nulle et le liquide, ainsi que les ulcérations, sont envahis secondairement par un flagellé (un Bodonien du genre Trimastix sp. ?) qui y pullule jusqu'à la mort de l'animal. La formation de ces bulles est la conséquence de l'infection du liquide cavitaire par la même bactérie, toujours présente dans le cœlome tant que dure la maladie et qui, dans les cas mortels, y pullule en quantités colossales. Comme toujours, la réaction de l'organisme contre l'infection s'accompagne d'une destruction considérable des urnes et autres éléments de défense. Ainsi s'explique le fait cité par plusieurs observateurs de l'absence d'urnes constatée chez certains individus (ces mêmes observateurs ajoutent, en effet, que dans ce cas on trouve dans le cœlome des débris d'urnes dégénérées). Or, l'animal est devenu très sensible aux réinfections jusqu'à la reconstitution intégrale du liquide cavitaire. Aussi, lorsque l'on trouve des siponcles porteurs de bulles épidermiques ou d'ulcérations superficielles incomplètement cicatrisées, faut-il les mettre en réserve et éviter de s'en servir pour les expériences.

Si j'ai cité ce dernier cas, c'est qu'il nous fournit un exemple intéressant d'une infection naturelle, spontanée, dont l'organisme se débarrasse par ses propres moyens et qui peut nous servir d'introduction à l'étude des processus défensifs tels que nous les révèle l'infection expérimentale.

c) **Etude du sang *in vitro*.** — Le liquide cœlomique une fois récolté dans un tube à essai stérile, puis laissé au repos, à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière, les éléments

figurés en suspension dans ce liquide ne tardent pas à tomber au fond et se superposer par ordre de pesanteur décroissante : les éléments sexuels (ovules et ballots de spermogonies) en premier lieu ; puis les érythrocytes, les amibocytes en dernier ; la colonne liquide ne tarde pas à se clarifier. Dans le plasma clair, seules les urnes continuent à nager ; elles montent et descendent en essaims pressés. Cette circulation des urnes peut être très facilement suivie à la loupe. Beaucoup de vésicules énigmatiques, dont le poids spécifique est vraisemblablement faible, surtout chez les éléments de grande taille, restent pendant assez longtemps en suspension, renvoyés d'un point à l'autre de la colonne liquide par le jeu vibratoire des urnes ; petit à petit, elles se déposent dans la couche superficielle du sédiment, mélangées aux amibocytes ; finalement, les urnes seules continuent à nager dans le plasma, qu'elles traversent et brassent énergiquement en tous sens. Chez le siponcle normal, les urnes ne manifestent qu'une très faible tendance à la précipitation ; parfois cependant, il arrive que, dès les premières heures qui suivent la saignée, elles montrent une tendance marquée à abandonner le liquide où elles nagent et à former avec les amibocytes et les vésicules énigmatiques des complexes cellulaires qui adhèrent fortement aux parois du tube ou qui se précipitent à la surface du sédiment ; dans ce cas, il faut admettre que l'on a affaire au sang d'un individu ayant récemment surmonté une infection.

D'ordinaire, les cellules gardent leur aspect normal et conservent leur activité propre pendant vingt-quatre heures au moins ; cette vitalité peut se prolonger au delà, et il nous est arrivé souvent de la constater encore deux jours après la saignée : les urnes continuent à fourmiller dans le plasma et à agglutiner les particules étrangères que l'on introduit dans le liquide ; les amibocytes conservent leur pouvoir phagocytaire et la propriété de former des plasmodia autour des corps étrangers ou des urnes épuisées ; on assiste à la naissance des vésicules énigmatiques jeunes et à leur multiplication ; les hématies conservent leur pigment et ne le laissent diffuser qu'au bout d'un temps très long : elles se divisent et se multiplient activement. Bref, l'ensemble des éléments figurés du sang accomplissent leurs fonctions physiologiques pendant un temps suffisamment prolongé pour permettre de reconstituer, par l'observation *in vitro,* le cycle complet des réactions cellulaires qui caractérisent un processus de défense.

Le sang ainsi conservé ne s'infecte guère spontanément, du

moins pendant les deux premiers jours, tant l'action antagoniste des cellules défensives reste vivace. Des observations répétées me permettent d'affirmer que les réactions cellulaires vis-à-vis des bactéries ou autres particules étrangères mélangées *in vitro* au liquide cavitaire sont très sensiblement comparables à celles que l'on observe sur le vivant. Il est aisé de comprendre dès lors à quel point ces circonstances facilitent l'étude du déterminisme qui préside aux réactions d'immunité chez ces animaux. Nombre de petits problèmes de la vie cellulaire peuvent être résolus par ce moyen, mais c'est surtout l'étude des différences qui caractérisent les réactions de défense chez l'animal normal et chez l'animal immunisé, qui bénéficie grandement des observations faites *in vitro*. Aussi n'avons-nous jamais manqué de contrôler par cette dernière méthode les résultats fournis par l'inoculation à l'animal vivant. C'est grâce à elle, par exemple, que nous avons pu démontrer l'immunité acquise par les cellules elles-mêmes vis-à-vis de l'action de certains poisons (poisons de l'*Adamsia Palliata*) ; c'est également l'étude du sang *in vitro* qui nous a permis d'analyser le mécanisme qui préside à la formation des caillots ou coagulats cellulaires. Il est à peine besoin de dire que l'observation *in vitro* est la seule méthode permettant d'étudier les propriétés du plasma dépouillé de ces cellules. Notons à ce propos que, pour obtenir un plasma débarrassé d'urnes, la centrifugation, même prolongée, ne suffit pas. Il faut, pour les éliminer, filtrer ce plasma (après sédimentation des éléments lourds) sur papier Chardin, qui retient toutes les urnes et toutes les vésicules énigmatiques sans exception.

Lorsqu'au liquide cavitaire d'un siponcle immunisé on ajoute une certaine quantité de l'antigène qui a servi à l'immunisation, un des phénomènes les plus caractéristiques (que l'on n'observe pas chez l'animal normal) est la tendance que présentent les différentes catégories de cellules défensives à s'agglomérer entre elles, à former des réseaux, des voiles, des ballots fortement agglutinés qui, très rapidement, se précipitent, se fixent sur les surfaces solides et y adhèrent fortement. Les phases successives par lesquelles passe la formation de ces complexes cellulaires sont d'une observation assez laborieuse : d'une part, à cause des modalités variées suivant lesquelles se combinent ces phénomènes de conglutination cellulaire ; de l'autre, à cause de la rapidité même avec laquelle se succèdent parfois les processus qui mènent à la constitution des caillots dans leur forme définitive. Je signale ici une méthode qui m'a donné les meilleurs

résultats pour l'étude de ces phénomènes. Le liquide cœlomique à étudier est recueilli dans une de ces boîtes de verre plates à fond incliné, dites boîtes de Laveran, et qui servent pour la coloration du sang impaludé ; on y ajoute un peu de l'émulsion bactérienne, puis aussitôt l'on immerge au fond des boîtes des lames porte-objets ; c'est à la surface de ces lames de verre que vont maintenant s'accomplir les réactions cellulaires dont nous poursuivons l'étude : formations de réseaux d'amibocytes, conglutination et lyse des urnes munies de leur charge, processus d'adhérences des urnes lysées aux vésicules énigmatiques, phagocytose, etc. Il faut veiller à ce que la face supérieure des lames de verre soit entièrement recouverte par le liquide. A des intervalles variables de cinq, dix minutes, etc., on retire les lames ; on en essuie avec soin l'une des faces, on attend quelques secondes, afin de permettre aux éléments cellulaires déposés d'adhérer au verre, puis on plonge la préparation dans un liquide fixateur ; nous employons dans ce cas particulier l'alcool-formol (alcool à 95° : 90 centimètres cubes ; formol : 10 centimètres cubes) ; au bout de deux heures, la préparation est placée pendant dix minutes dans l'alcool méthylique, puis l'on colore par la solution de Giemsa faible (une demi-goutte de solution par centimètre cube d'eau bidistilée et ramenée à la neutralité). Les cellules sont ainsi saisies et fixées sur le vif, en plein mouvement, avec leurs rapports naturels exactement conservés ; l'on peut de la sorte suivre pas à pas l'évolution de certains processus cellulaires passablement compliqués. Cette méthode, très démonstrative, pourra trouver, je crois, d'autres applications du même genre.

d) **Cocaïnisation des animaux.** — L'emploi de l'anesthésie par la cocaïne, chez les siponcles, permet dans certains cas de recueillir des renseignements intéressants relativement à l'étude de certains processus cellulaires. Cette anesthésie ne touche pas, en effet, à un égal degré toutes les catégories d'éléments ni toutes les fonctions cellulaires ; elle permet de suspendre certaines de ces fonctions et d'en laisser subsister d'autres. Elle s'oppose, entre autres, souvent à la formation de réseaux ou de conglomérats cellulaires, empêche les phénomènes de conglutination dans lesquels interviennent les leucocytes, maintiennent ceux-ci à l'état de dispersion dans le liquide et les empêche de passer de l'état quiescent à l'état actif. Cependant, l'activité vibratoire est atténuée, mais non suspendue chez les urnes, qui continuent

à sécréter en abondance leur substance agglutinante et à fixer en masse les bactéries à leur pôle glandulaire.

Nous nous sommes servi pour nos expériences d'une solution de chlorhydrate de cocaïne à 6 % dans l'eau de mer. Une injection dans le cœlome avec 0 cc. 5 (correspondant à 0 gr. 015 de cocaïne) met l'animal en résolution totale en moins d'un quart d'heure, après une courte phase d'excitation ; il recommence à réagir aux excitations extérieures au bout de huit heures environ ; il lui faut une vingtaine d'heures pour reprendre toute son activité. Une injection de 2 centimètres cubes de la solution à 6 %, correspondant à 0 gr. 12 de cocaïne, met en moins de cinq minutes l'animal en état de relâchement musculaire complet ; cette forte dose est néanmoins parfaitement supportée. Au bout de vingt-quatre heures, l'animal a repris sa tonicité musculaire, mais se contracte encore paresseusement.

CHAPITRE III

LE LIQUIDE CŒLOMIQUE A L'ÉTAT NORMAL

Le poids d'un siponcle d'assez forte taille oscille autour de 63 grammes d'après Deckhuysen ; le liquide cœlomique représente 57,7 % à 62,8 % du poids total du corps. Dans le chapitre précédent, nous avons donné un certain nombre d'indications sur les quantités de liquide cœlomique que peut fournir un siponcle, sur la façon de pratiquer la saignée, sur la sédimentation *in vitro* des cellules sanguines ; nous n'y reviendrons pas.

a) **Caractères physiques et composition chimique du plasma.** — Les siponcles absorbent de l'eau et diluent leur liquide viscéral lorsqu'ils sont plongés dans un milieu hypotonique ; ils perdent de l'eau dans un milieu hypertonique et reprennent lentement leur poids lorsqu'on les remet dans l'eau de mer. Quand la paroi du corps est intacte, on ne constate pas de passage de sels à travers les téguments ; cette paroi se comporte, par conséquent, à la façon d'une membrane semi-perméable. La contenance en chlorures du liquide cœlomique est de 33,25 % (Deckhuysen).

Les quelques indications qui vont suivre, et que nous croyons utiles de consigner ici, sont empruntées pour la plupart au travail de M^lle^ A. Damboviceanu.

Le sang total centrifugé, puis filtré immédiatement après une saignée, fournit environ 10 à 12 centimètres cubes de plasma pour un siponcle de belle taille ; le Δ cryoscopique de ce plasma est en moyenne (pour la région de Roscoff) de 2,057, celui de l'eau de mer dans les bacs de l'aquarium étant au même moment de 2,043. On voit que le point de congélation de ce plasma est très voisin (légèrement supérieur) de celui de l'eau de mer ambiante. On le savait déjà d'après les observations de Bottazzi. La densité du plasma est en moyenne de 1,0256 ; sa tension superficielle relative est de 1,053.

Le pH du plasma est égal à 7,6, celui de l'eau de mer dans les bacs étant au même moment de 8,1. La réaction du plasma s'éloigne, par conséquent, légèrement de celle de l'eau de mer dans le sens de l'acidité.

Ces différents facteurs : Δ cryoscopique, tension superficielle, densité du plasma, réaction du milieu, ne varient guère chez les siponcles immunisés ; on verra qu'il n'en est pas de même du pH intérieur de certains éléments cellulaires.

Quand on porte à l'ébullition le plasma débarrassé de ses cellules, il devient légèrement opalescent sans coaguler ou du moins sans précipiter ; en milieu acétifié, il donne par la chaleur un précipité floconeux qui présente tous les caractères des substances albuminoïdes (réaction xanthoprotéique, réaction du biuret, précipitation par l'alcool, l'acétone, le tanin, l'acétate de cuivre, le sublimé, etc.). Après dialyse prolongée, le plasma devient opalescent sans donner de précipité dosable ; 75 % des protéines qu'il contient sont précipitées par NaCl ou SO^4 à saturation totale, ou à demi-saturation par SO^4 Am^2. Après filtration, il coagule encore par la chaleur et précipite par addition de SO^4 Am^2. On trouve dans les plasmas une substance de la nature des mucines, mais ne fournissant pas de sucre à l'hydrolyse. Une fois les protéines coagulables éliminées, le plasma ne contient ni albumose, ni peptone, ni urée, ni acides aminés, ni sucres réducteurs ; il renferme des traces de lécithine et de cholestérine. On n'y décèle ni ferments protéolytiques, ni ferments lipolytiques, mais bien des ferments oxydants (oxydase) et des ferments réducteurs (catalase).

On verra, dans la suite de ce travail, que chez les siponcles immunisés les protéines du plasma augmentent dans de notables proportions. La substance protéique dissoute dans le plasma flocule à la cathode, ainsi que nous l'avons démontré avec Vlès.

A cela se bornent à peu près les notions que nous possédons

actuellement sur les constantes physico-chimiques du plasma de Sipunculus Nudus.

b) **Examen microscopique du sang et méthode de coloration.** — Il est indispensable, dans tous les cas, d'examiner le sang frais entre lame et lamelle. Si cette méthode d'examen, trop souvent négligée par les microbiologistes, est toujours nécessaire, elle l'est plus encore qu'ailleurs dans le cas du siponcle ; le processus compliqué de l'agglutination par les urnes ne peut, en effet, être suivi que par ce procédé. L'emploi du rouge neutre mélangé au liquide examiné ne doit jamais être négligé ; il permet de suivre l'évolution des vacuoles intracellulaires et les phases successives de la digestion intracellulaires à l'intérieur de la masse agglutinées au pôle postérieur des urnes.

La fixation d'une goutte de sang frais par les vapeurs osmiques et son examen direct, sans coloration, entre lame et lamelle, est un procédé supérieur à tous les autres pour observer en détail la structure des cellules sanguines, en particulier de leur noyau. C'est, associée à la coloration *in vivo* par le rouge neutre, la méthode de choix pour étudier la structure fine de l'urne.

Pour colorer sur lame le liquide cavitaire après fixation, nous avons employé divers procédés. D'une façon générale, nous avons rejeté la méthode couramment employée chez les vertébrés et qui consiste à laisser sécher à l'air, et avant toute fixation, le sang étalé sur lame. Il est bon de commencer par fixer immédiatement aux vapeurs osmiques la goutte légèrement étalée. Après quoi l'on peut laisser sécher à l'air et compléter la fixation par quelque autre méthode ; ou, sinon, il faut fixer avant dessiccation, mais après avoir attendu une minute pour laisser aux cellules le temps d'adhérer au verre. Or, on risque par ce procédé de voir un grand nombre d'urnes entraînées par la solution fixatrice.

La méthode dont nous nous sommes servi le plus communément est la suivante : la goutte de liquide cavitaire, très légèrement étalée sur lame, est exposée avant dessiccation pendant une minute aux vapeurs osmiques. On laisse sécher à l'air ; on achève la fixation pendant vingt minutes par l'alcool méthylique ; on colore longuement (plusieurs heures en renouvelant une fois le liquide colorant) dans la solution de Giemsa faible (une demi-goutte par centimètre cube dans l'eau bidistillée) ; on différencie à l'alcool à 70° et l'on monte dans l'huile de cèdre après dessiccation à l'air. C'est de toutes les méthodes que j'ai

employées la plus facile à appliquer et celle qui m'a donné les meilleurs résultats.

La fixation par la solution d'acide chromique à 0,25 % ou par le liquide de Bouin, après demi-dessiccation, et suivie de la coloration par le Giemsa faible (après lavage prolongé à l'eau), réussissent également très bien.

Quant à l'étude des lames immergées directement dans le liquide cavitaire, le procédé employé par nous a été décrit au chapitre précédent, auquel nous renvoyons le lecteur.

Une méthode qui nous a fourni beaucoup de renseignements utiles est la coloration par le mélange vert de méthyle-pyronine. On fixe le sang frais aux vapeurs osmiques pendant quelques secondes ; on laisse sécher sur lame ; on fixe à nouveau pendant une demi-heure à l'alcool méthylique ; puis l'on colore par la solution colorante à froid pendant trois heures, ou, mieux encore, à chaud, au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool, jusqu'à émission de vapeurs ; on lave très rapidement à l'eau et l'on sèche aussitôt au papier mousseline. Les bactéries se colorent en rouge, ainsi que les granules provenant de la lyse de ces dernières. Les bactéries digérées forment à l'intérieur des amibocytes des masses amorphes intensément pyroninophiles ; à mesure que ces résidus se transforment en corps bruns, ils perdent leur affinité pour la pyronine, qui ne colore plus les corps bruns constitués (planche II, figures 11 à 15).

c) **Hématies.** — Nous ne dirons rien de la morphologie tant de fois décrite des hématies. Nous noterons seulement quelques faits épars relatifs à ces éléments et glanés au cours de nos recherches.

Tous les auteurs ont signalé dans le cytoplasma des érythrocytes la présence d'inclusions diverses. Les descriptions qu'ils en donnent sont loin d'être concordantes. Voici ce que j'ai pu constater à cet égard : dans un érythrocyte adulte, les inclusions se présentent sous trois aspects différents : 1° de petits granules jaunâtres, réfringents, en nombre variable, animés d'un mouvement brownien extrêmement vif, qui persiste après fixation par les vapeurs osmiques. Dans les hématies jeunes, ils sont beaucoup plus nombreux que dans les cellules adultes. Ils ne se colorent point par la pyronine ; les vapeurs osmiques les teintent en gris foncé. Ils disparaissent dans les globules usés, touchant à leur fin. Ils sont tantôt libres dans le cytoplasma, tantôt contenus dans de petites vacuoles. Leur nombre devient très

grand vers la fin d'une infection expérimentale : à ce moment, le cytoplasma en est littéralement criblé. Ce dernier fait vient à l'appui de l'opinion de Cuénot, qui les considère comme des produits de déchets. 2° Un gros granule peu réfringent, jaune verdâtre, fixe, enfermé dans une petite vacuole et se colorant en rouge vif par la pyronine après fixation ; ce granule est généralement unique à l'état normal, mais, dans les érythrocytes géants (macrocytes) que l'on observe au cours des états d'anémie, on en trouve un plus grand nombre (de six à dix). Lors de la division nucléaire, il apparaît dans le cytoplasma autant de granules pyroninophiles que de noyaux ; chacun d'eux accompagne un des noyaux quand se produit la division cytoplasmique. Ce granule n'existe pas dans les érythrocytes vieillis ; il manque souvent dans les érythrocytes jeunes, où existent à peu près exclusivement les inclusions de la première catégorie. 3° Des vacuoles en nombre et de dimensions très variables ayant toutes pour caractère commun de se colorer avec intensité par le rouge neutre ; elles n'ont pas d'affinité pour la pyronine ; petites et nombreuses dans les hématies jeunes, elles grossissent et se fusionnent entre elles à mesure qu'évolue la cellule et constituent finalement ces grosses inclusions (incolores sur le vivant) souvent uniques dans les hématies adultes et qu'ont signalées, avec des interprétations différentes, Metalnikov, Kollmann et Hérubel. Il est très difficile de dire s'il existe entre ces diverses formations un lien génétique ; il semble bien que les petites vacuoles dans lesquelles flottent les inclusions de la première catégorie (inclusions à mouvements browniens) fassent partie de ce dernier groupe.

Le sérum d'Eupagurus Prideauxii doué, comme nous l'avons montré, d'un pouvoir lytique considérable sur les globules rouges des vertébrés, détermine également l'hémolyse des hématies du siponcle, mais laisse intact le gros granule pyroninophile. De même, le sérum des *Maia squinado* immunisées contre le sang de siponcle et qui possède un pouvoir hémolytique considérable sur les cellules sanguines de cet animal (thricholyse des urnes, ovulolyse, érythrocytolyse totale) ne dissout pas ces granules qui, après la fonte de leur support cytoplasmatique, flottent en liberté dans le liquide ambiant.

Le cytoplasma des érythrocytes adultes, après la coloration par la solution de Giemsa, est amphophile, avec légère tendance vers la basophilie ; il évolue vers l'acidophilie en vieillissant ; les globules usés, dont le noyau commence à entrer en kario-

lyse, ont un cytoplasma franchement acidophile. La sénescence de la cellule est marquée par la disparition des diverses inclusions que nous avons décrites, fait également observé par Hérubel ; la cellule se plisse, ses bords deviennent crénelés ; dans son cytoplasma apparaissent de minuscules grains se colorant en noir par l'acide osmique.

Quel est le sort ultime des hématies hors d'usage ? et comment retrouver leur trace. Il est *a priori* peu probable qu'elles subissent une cytolyse dans le plasma même : c'est là un processus qui n'est pas habituel dans la série animale quand il s'agit de résorbtion de cellules vieillies. Notons d'abord que jamais nous n'avons observé la participation des hématies à la formation des complexes (caillots) cellulaires qui caractérisent les réactions d'immunité vers la fin d'une infection victorieusement surmontée ou au commencement d'une réinfection expérimentale chez les individus immunisés. Ces complexes formés d'urnes, de vésicules énigmatiques et d'amibocytes, ne renferment dans leur masse ni hématies ni produits sexuels. Seules les cellules défensives concourent à leur formation ; ils finissent par se transformer en corps bruns qui s'accolent à d'autres corps bruns analogues, contribuant à former les masses brunes volumineuses qui encombrent souvent la région antérieure du cœlome. Or, lorsque l'on étudie le contenu de ces masses, on y trouve en quantité des hématies à forte réaction éosinophile, plus ou moins dégénérées et mélangées à des déchets cellulaires de toutes sortes. C'est évidemment dans les corps bruns que les hématies trouvent leur fin naturelle, de même que toutes les cellules hors d'usage de la cavité générale. Par quel mécanisme y parviennent-elles ? D'après nos observations, un double processus peut intervenir ici. Un des vecteurs des hématies usagées sont ces disques ciliés que nous décrirons plus tard et qui sont constitués par le pôle glandulaire détaché de l'urne après que le corps globuleux de celle-ci a subi la lyse. L'urne intacte maintient à distance les érythrocytes : jamais ceux-ci, tant qu'ils ne sont pas altérés, ne sont entraînés par le jeu des cils, ni ne viennent adhérer au pôle postérieur. Sitôt que le bourrelet cilié se détache et s'étale en prenant une forme discoïde, il perd toute action répulsive sur les érythrocytes ; un grand nombre de ces derniers viennent alors se coller à sa surface et y former une véritable mosaïque d'hématies qui, par pression réciproque, prennent la forme polygonale. Celles qui viennent de la sorte se fixer sur le disque sont très probablement les hématies qui, par suite de quelque modi-

fication dégénérative, ont acquis des propriétés adhésives nouvelles (planche XII, fig. 1 et 2). Ces disques chargés d'érythrocytes hors d'usage ne tardent pas à être enfermés dans de vastes « plasmodia » leucocytaires et à être finalement incorporés aux corps bruns. Cette incorporation se fait également par un autre mécanisme, qui semble être le plus usuel : à l'intérieur des complexes (caillots) cellulaires, les vésicules énigmatiques subissent à la fin du processus une véritable fonte ; elles se plissent, prennent l'aspect de sacs vides et laissent échapper leur contenu ; il se forme de la sorte, tout autour du caillot, une sorte d'atmosphère visqueuse fortement acidophile et dans laquelle nombre d'hématies viennent s'engluer ; de cette façon, elles se trouvent incorporées aux corps bruns définitifs.

Notons ici que les états d'anémie qui succèdent aux infections sont caractérisés entre autres par un état d'anisocytose prononcé des hématies. A côté des érythrocytes normaux, l'on trouve des éléments nains (micocytes) et des éléments géants dont le diamètre mesure de trois à quatre fois celui d'une hématie normale (macrocytes) (planche I, fig. 1 à 3).

Ces états sont suivis d'un processus de réparation et de régénération cellulaire. Il y a multiplication active des hématies dans le liquide cavitaire ; il est d'autant plus facile de suivre les stades divers de ce phénomène, que cette multiplication s'accomplit également *in vitro*. La multiplication se fait par division directe du noyau ; je n'ai jamais observé de mitoses. L'hématie normale acquiert les dimensions d'un macrocyte ; son noyau grossit sensiblement ; un premier étranglement nucléaire se produit, suivi bientôt d'un second ; la division nucléaire s'accompagne de l'apparition dans le cytoplasma de deux, puis de quatre granules pyroninophiles. Nous n'avons pas pu établir si ces granules proviennent par division les uns des autres ; chacun d'eux émigre au voisinage de l'un des noyaux. Le cytoplasma s'étrangle à son tour et chacune des cellules nouvelles emporte avec le noyau un granule unique. Ces grands hématoblastes contiennent, au moment où va se faire la division nucléaire, un corps, d'aspect amorphe coloré en jaune-brun, dépassant souvent le noyau en dimension, de nature indéterminée et qui disparaît lorsque la division est achevée. Peut-être s'agit-il d'une substance résiduelle expulsée au cours de la segmentation (planche I, fig. 4 à 7). Signalons enfin l'existence dans le sang en voie de régénération de grandes lames anuclées dont la structure réticulée rappelle celle des hématies et qui sont peut-être des restes du cytoplasma des

hématoblastes éliminés au moment de la division de ce dernier.

En ce qui concerne le signe de la charge électrique, on verra plus loin que, dans les expériences de cataphorèse, les hématies se rassemblent à la cathode et ont par conséquent, dans leur milieu normal, une charge positive.

d) **Amibocytes.** — Les différentes catégories d'amibocytes ont été bien des fois décrites et étudiées chez le siponcle depuis le premier travail de Cuénot, et les observateurs sont aujourd'hui à peu près d'accord sur leurs caractères différentiels. Nous-même, d'après nos recherches personnelles, distinguons trois groupes principaux.

1° Les *amibocytes hyalins,* dépourvus de granulations colorables par les solutions acides ou basiques. Ce sont au premier chef des phagocytes. Ils dérivent d'une forme primitive à cytoplasma peu abondant et que, pour la commodité du langage, on peut désigner sous le nom de lymphocytes.

2° Les *amibocytes à petites granulations* amphophiles, mais avec tendance très accentuée vers l'éosinophilie lorsqu'on les colore par la solution de Giemsa. Dans certains cas assez rares, ces granulations présentent une réaction basophile assez marquée ; parfois aussi, ils contiennent un mélange de grains éosinophiles et basophiles ; il y a là des variations en rapport avec l'état physiologique de la cellule que l'on observe parfois aussi chez les mammifères. Ils dérivent manifestement d'amibocytes hyalins qui, petit à petit, se chargent de granulations acidophiles. Ces amibocytes sont également doués de propriétés phagocytaires.

3° Des amibocytes de forte taille, bourrés de grosses sphérules réfringentes et présentant une réaction nettement amphophile, avec tendance à l'éosinophilie chez les éléments jeunes, à la basophilie chez les éléments plus âgés. Ces éléments mùriformes dérivent, eux aussi, directement des amibocytes hyalins ; les premières sphérules qui apparaissent dans le cytoplasma de ces derniers sont de réaction légèrement acidophile. Le noyau de ces éléments est toujours très excentrique et situé superficiellement, à la périphérie de la cellule. Les sphérules ne présentent aucune des réactions des graisses et sont probablement des substances de réserve de nature albuminoïde. Bien qu'ils soient dépourvus d'activité phagocytaire, leur nombre diminue considérablement à la suite d'un effort de l'organisme (comme, par exemple, au cours d'un processus infectieux). Ils émettent de courts pseudopodes.

On rencontre fréquemment dans le liquide cœlomique, surtout vers la fin d'une réaction de défense, des phagocytes géants, à un seul noyau, bourrés de vacuoles et contenant divers résidus provenant de la digestion intracellulaire d'autres cellules (amibocytes ou hématies). Ces macrophages dérivent également, semble-t-il, des amibocytes hyalins. Ils sont, en général, dépourvus de granulations (planche II, fig. 1-10).

La proportion relative de ces diverses catégories d'amibocytes varie avec l'état physiologique de l'animal. Les amibocytes à fines granulations éosinophiles sont toujours les plus nombreuses, sauf dans les cas de réparation active des éléments du liquide cavitaire, survenues après une infection grave, avec destruction énergique des cellules sanguines; dans ce dernier cas, le processus de réparation débute toujours par une invasion d'amibocytes hyalins.

Chez un siponcle d'apparence normale, la proportion moyenne est de : amibocytes hyalins (y compris les lymphocytes), 21 %; amibocytes à petites granulations éosinophiles, 64 %; amibocytes mûriformes, 15 %. Trois jours après le début d'une infection expérimentale non mortelle, nous trouvons : amibocytes hyalins, 17 %; amibocytes granuleux, 76 %; amibocytes mûriformes, 7%. Six jours après la fin du processus infectieux, on trouve : amibocytes hyalins, 34 %; amibocytes granuleux, 59 %; amibocytes mûriformes, 7 %. Enfin, quinze jours après l'infection, alors que le sang est en pleine réparation, on trouve : amibocytes hyalins, 46 %; amibocytes granuleux, 42 %; amibocytes mûriformes, 12 %.

D'une façon générale, l'on peut dire qu'au cours d'une infection de moyenne intensité il y a baisse considérable du nombre total des amibocytes, cette leucopénie atteignant plus particulièrement les amibocytes hyalins ; la plupart des amibocytes sont incorporés dans les masses cellulaires agglutinées et disparaissent du liquide cavitaire. Sitôt que l'animal va vers la guérison, la réparation du sang se manifeste par une surproduction générale des amibocytes et par un accroissement considérable de la proportion d'hyalins, proportion qui, petit à petit, tendra de nouveau vers la normale. Cette surproduction d'amibocytes, au moment où commence à s'établir l'immunité, est telle que, dans certains cas, nous avons vu le nombre de ces éléments atteindre jusqu'à 80 % du nombre total des hématies. La leucopénie suivie d'hyperleucocytose marque deux moments d'une infection surmontée par l'organisme. Au cours des infections

mortelles, il y a disparition à peu près totale des leucocytes de toutes catégories.

Les amibocytes forment souvent entre eux des agglomérations dont la forme et les caractères varient avec les conditions physiologiques ou mécaniques du milieu. Selon les circonstances, ces agglomérations se présentent tantôt sous forme de ballots agglutinés, tantôt sous forme de réseaux lâches, tantôt sous celle de « plasmodia » ou cellules géantes, tantôt enfin sous forme de minces membranes de revêtement constituées autour de certaines surfaces.

Les ballots agglutinés se forment très rapidement, presque instantanément, au sein du liquide, et cela non seulement *in vitro,* mais aussi, chez l'animal vivant, toutes les fois qu'il y a rupture de l'équilibre humoral, par exemple consécutivement à l'introduction brusque de particules étrangères dans le liquide cavitaire; il y a là une agglutination spontanée des cellules qui adhèrent fortement les unes aux autres en se juxtaposant et en constituant des amas plus ou moins sphéroïdaux. Ces ballots sont généralement hérissés à la périphérie de courts pseudopodes épineux. Ces amas agglutinés ne comprennent que des phagocytes (amibocytes hyalins et granuleux), jamais d'amibocytes mûriformes à grosses sphérules. Ils s'accolent en flottant à d'autres amas semblables et donnent ainsi naissance à des masses de plus en plus volumineuses. Une fois constitués, ils ne semblent pas se dissocier ; au bout d'un certain temps, des phénomènes de cytolyse se produisent au centre de l'amas, alors qu'à la périphérie les amibocytes semblent conserver leur individualité cellulaire. Lorsque ces amas leucocytaires se forment (*in vivo* ou *in vitro*) à la suite de l'introduction de particules étrangères dans le liquide, on voit ceci : il y a accolement instantané des particules aux amibocytes libres dont la surface présente peut-être à ce moment-là une viscosité spéciale ; l'accolement précède immédiatement l'agglutination des amibocytes, quelque rapidement que celle-ci s'effectue; ces particules se trouvent de la sorte incorporées dans la masse des cellules agglutinées. La phagocytose s'accomplit alors au sein de l'amas lui-même, qui ne tarde pas à être bourré de corps bruns (planche v, fig. 2).

Une partie seulement des amibocytes présents dans le liquide participent à ce phénomène d'agglutination. Beaucoup restent libres, à l'état isolé, sans qu'il nous soit possible de distinguer les conditions qui déterminent l'agglutination des uns et non des autres.

L'agglutination des amibocytes se présente sous un aspect très différent à la surface de lames immergées dans le liquide ; dans ce cas, on assiste à la formation rapide des réseaux ; les cellules s'étalent, s'étirent, prennent la forme étoilée ou s'allongent en rubans ; de leurs corps émanent des traînées hyaloplasmiques d'aspect visqueux qui ne sont certainement pas des pseudopodes ; ces traînées, souvent très longues, s'accolent à des prolongements semblables émanés d'autres corps cellulaires et s'anastomosent avec eux. De la sorte se constituent des réseaux dont les diverses parties sont intimement liées entre elles, et au sein desquels un certain nombre de cellules semblent subir une cytolyse, avec disparition des granulations et diffusion de la chromatine dans le cytoplasma (planche IV et planche V, fig. 1).

Si l'agglutination des cellules est un phénomène normal dû à une modification brusque de l'équilibre humoral et qui, dans le cas des surfaces immergées, se fait sous la forme des réseaux que nous venons de décrire, par contre, la cytolyse partielle observée au sein de ces formations est un phénomène pathologique et semble due au choc provoqué par le contact brusque de particules étrangères, en particulier de bactéries qui viennent s'accoler aux amibocytes. Cette lyse, en effet, manque ou tout au moins s'observe sous une forme très atténuée chez les individus immunisés. En même temps que les réseaux se constituent, les bactéries en suspension dans le liquide viennent adhérer en masse à la surface des corps cellulaires et des prolongements visqueux qui en émanent. C'est là une phase du phénomène qui précède la phagocytose et la prépare. En somme, nous avons affaire ici à un processus analogue à celui qui, au sein du liquide, conduit à la formation des ballots ; l'aspect différent sous lequel se présentent dans l'un et l'autre cas les mêmes conglomérats cellulaires, semble lié simplement aux conditions mécaniques dans lesquelles l'agglutination s'est effectuée. Notons que les prolongements émanés des cellules n'ont rien à voir avec la fibrine et qu'ils ne se colorent pas par la méthode de Weigert.

Cette agglutination en masse sur des surfaces planes se produit surtout chez les individus neufs, à l'occasion d'un brusque contact avec l'antigène. Chez les individus immunisés contre cet antigène, l'agglutination en réseaux est généralement remplacée par la formation de vastes « plasmodia » nés de la confluence des cytoplasmes amibocytaires et dans lesquels disparaît toute individualité cellulaire. Ces cellules géantes se forment avec une étonnante rapidité. Chez des siponcles immunisés contre le *B. tume-*

faciens, dont le sang a été mélangé *in vitro* avec une émulsion de ce bacille, elles sont déjà complètement constituées, à la surface de lames immergées dans le mélange, quinze minutes après la confection de ce dernier. Les amibocytes bourrés de bactéries (la phagocytose, dans ce cas, est d'une étonnante précocité) fusionnent leurs cytoplasmes et donnent naissance à des formations en tous points comparables avec les cellules géantes d'origine inflammatoire que l'on rencontre dans toute l'étendue de la série animale ; les noyaux, en parfait état de conservation, occupent une position plus ou moins périphérique. A leur formation concourent les leucocytes granuleux aussi bien que les hyalins. Ils sont doués d'énergiques propriétés phagocytaires et la digestion intracellulaire s'y accomplit soit à l'intérieur de vacuoles, soit à même le cytoplasma. Chez les individus immunisés, des « plasmodia » analogues se forment (*in vivo* et *in vitro*) autour des urnes hors d'usage ou des disques ciliés chargés de particules d'antigène. C'est là, à l'intérieur de semblables formations, que les urnes trouvent d'habitude leur fin naturelle. Ces plasmodes phagocytaires finissent à leur tour par être incorporés aux corps bruns (planche v, fig. 2, et planche vi, fig. 1 et 2).

La surface des corps bruns définitivement constitués nous offre le type le plus achevé du groupement des amibocytes en minces membranes de revêtement. Elles enveloppent ces formations d'un syncytium continu, à la façon d'un endothélium.

Chez les individus normaux cocaïnisés, aucune de ces formes d'agglomération leucocytaire n'apparaît tant que dure l'anesthésie ; les amibocytes restent isolés et dispersés dans le liquide ou bien accolés à la masse visqueuse sécrétée par les urnes, individuellement et sans contracter d'adhérence avec les amibocytes voisins.

La fonction phagocytaire ne donne guère lieu à des remarques particulières. Parmi les amibocytes, seuls les hyalins et les amibocytes à petites granulations éosinophiles sont doués de cette propriété. La digestion s'accomplit généralement à l'intérieur de grandes vacuoles, au sein desquelles il est aisé de suivre la transformation graduelle des substances phagocytées en corps bruns (planche iii, fig. 1-15). Ces résidus de la digestion intracellulaire se colorent énergiquement par le rouge neutre. Dans un amas de particules albuminoïdes agglutinées par les urnes, l'emploi du rouge neutre permet de distinguer nettement les éléments phagocytés de ceux qui ne le sont pas, ces derniers restant incolores après l'emploi de la teinture. Au contraire, la pyronine, qui colore

en rouge vif les substances phagocytées aux premières phases de la digestion, cesse de les colorer sitôt que la digestion est plus avancée. Les corps bruns définitifs n'ont plus aucune affinité pour cette matière; c'est ainsi qu'à l'intérieur d'un même phagocyte on peut voir des inclusions teintées par la pyronine en rouge, à côté d'autres qui, après coloration, gardent leur teinte jaune-brun ; entre ces deux extrêmes, on rencontre toute la gamme des nuances intermédiaires. La pyronine, comme on le voit, constitue un excellent réactif pouvant servir à déterminer l'état plus ou moins avancé de la digestion intracellulaire (planche II, fig. 11-15).

Signalons, en terminant ces quelques observations relatives aux amibocytes, que, dans les expériences de cataphorèse, les amibocytes hyalins, ainsi que ceux à fines granulations éosinophiles, se comportent comme pratiquement neutres; ils se rendent indifféremment aux deux pôles. Les amibocytes à grosses granulations amphophiles, qui sont dépourvues de tout pouvoir phagocytaire, sont transportées, comme les hématies et les urnes, au pôle négatif et portent, par conséquent, dans un milieu normal, une charge positive.

e) **Urnes.** — Je passe sur la description morphologique de l'urne et renvoie aux mémoires de Cuénot, Métalnikov, Ladreyt, Hérubel, etc. Je me borne à insister sur certains points controversés ou peu étudiés.

Et d'abord comment orienterons-nous notre urne ? Elle se déplace, le pôle cilié en arrière, la région vésiculaire en avant. Nous désignerons, en conséquence, le pôle glandulaire sous le nom de pôle postérieur, le pôle vésiculeux sous celui de pôle antérieur. Tout point compris entre le pôle glandulaire et le pôle vésiculeux est situé en avant du premier, en arrière du second.

Il existe chez *Sipunculus Nudus* des urnes libres et des urnes fixées. Les premières l'emportent de beaucoup numériquement. Nous avons rencontré les secondes à la surface des brides très minces, flottant dans le liquide cavitaire, et qui unissent l'intestin à la paroi du corps. L'une de ces brides, examinée entre lame et lamelle, montre des urnes fixées par un court pédoncule. Au reste, leur structure est identique à celle des urnes libres. Généralement, les urnes libres sont de taille sensiblement égale. A certains moments néanmoins, l'on constate parmi ces éléments une très grande diversité dans les dimensions ; c'est principalement pendant la période de réfection sanguine qui succède aux infec-

tions graves, prolongées ou répétées, que nous avons pu observer le phénomène d'anisocytose s'appliquant aux urnes. C'est ainsi qu'après des injections répétées de *B. tumefaciens* aux siponcles, nous avons vu apparaître dans le liquide de nombreuses formes géantes, toujours uninucléées et d'un volume de deux à quatre fois supérieur à celui des urnes normales. Mais c'est là un phénomène qui marque la fin d'un processus pathologique. Ces « urnes grandes », pour employer l'expression d'Hérubel, témoignent d'une activité agglutinante particulièrement énergique.

Je note ici que la lumière ne semble exercer sur les urnes aucune action tropique, et que des urnes en suspension dans le plasma que l'on soumet, sur fond noir, à l'action de rayons lumineux, ne manifestent aucun phototropisme, positif ou négatif.

L'urne doit être considérée comme une cellule glandulaire ciliée ; une énorme vacuole remplissant la presque totalité de l'élément constitue le corps globuleux, le cytoplasma granuleux étant entièrement refoulé au pôle postérieur glandulaire, auquel il constitue une calotte contenant le noyau.

Les urnes, chez *Sipunculus Nudus,* sont des éléments mononucléés. Le noyau unique est situé au voisinage du pôle postérieur, à la périphérie de la cellule et immédiatement en avant du bourrelet glandulaire cilié. Rien n'est plus facile que de mettre en évidence ce noyau sur des urnes fixées aux vapeurs osmiques après coloration *intra vitam* par le rouge neutre. Le cytoplasma entourant le noyau est particulièrement riche en granulations ayant de l'affinité pour ce colorant (planche VII, fig. 2). Il n'existe pas d'autre noyau, ainsi que l'ont cru certains observateurs. Lors de la lyse des urnes, le bourrelet cilié se détache souvent et flotte pendant quelque temps dans le liquide sous forme d'un disque cilié aplati, ayant généralement gardé à sa périphérie le noyau de l'urne (planche XII, fig. 1 et 2). Jamais, sur la surface bien étalée de l'élément, on ne peut découvrir de second noyau. Ce qui a induit en erreur certains observateurs, c'est la présence presque constante au pôle glandulaire d'amibocytes très étalés et très adhérents à cette surface : leurs noyaux ont parfois été décrits comme appartenant à l'urne elle-même.

Après coloration *in vivo* par le rouge neutre, la portion glandulaire tout entière apparaît comme parsemée d'une infinité de petits grains rouges, particulièrement abondants autour du noyau. ils manquent totalement sur le reste de la surface de l'élément (planche VII, fig. 2). Tout autour du bourrelet, une série de petits

bâtonnets érythrophiles sont implantés en palissade, un à la base de chacun des cils. Au niveau du noyau, on voit parfois le cytoplasma périnucléaire émettre dans le liquide ambiant de fins pseudopodes que les vapeurs osmiques fixent avec beaucoup de netteté et qui ne jouent aucun rôle dans la préhension de particules extérieures. *L'urne est, en effet, complètement dépourvue de pouvoir phagocytaire.*

Les cils sont très nombreux, serrés et longs ; leurs mouvements sont d'une extraordinaire rapidité ; il y a là une dépense continue d'énergie des plus impressionnantes pour l'observateur qui assiste pour la première fois à ce spectacle. Les cils sont disposés en couronne tout autour du bourrelet glandulaire. Leur extrémité distale, tantôt s'écarte de l'axe antéro-postérieur de l'urne, tantôt s'en rapproche ; ce mouvement de va-et-vient détermine un appel continu du liquide ambiant au fond de l'espèce d'entonnoir délimité par la couronne ciliaire. A certains moments, toutes les extrémités se rapprochent, s'accolent en flamme de bougie ; ce qui prédomine alors, c'est l'énergique frottement des filaments les uns contre les autres. Très souvent aussi, la masse entière des cils se divise en deux faisceaux bien distincts : une masse postérieure principale dont le mouvement vibratoire s'exécute, comme nous l'avons décrit, tout autour de l'axe principal de l'urne ; une masse antérieure moins importante, divergente, située dans un plan perpendiculaire à cet axe et qui est précisément celui au niveau duquel s'opère le triage des éléments dont il sera question plus loin. Lorsque l'on voit les hématies du siponcle rigoureusement repoussées et maintenues à distance en regard de ce faisceau antérieur, le souvenir du phénomène décrit en physique sous le nom de « vent électrique » se présente à l'esprit.

On connaît l'action lytique qu'exerce sur toute espèce de cellule le sérum d'*Eupagurus Prideauxii ;* ajouté en faible quantité au plasma dans lequel nagent les urnes, il détermine en quatre ou cinq minutes la lyse totale des cils, qui se désintègrent en files de granulations rapidement lysées à leur tour. Cette thrycholyse se produit également au contact du sérum de *Maia Squinado* immunisée contre le sang de siponcle.

On rencontre souvent dans le liquide cavitaire, surtout après une période de suractivité des cellules sanguines, de grands éléments discoïdes, aplatis, dont le diamètre atteint parfois le double et le triple de celui d'une urne de taille moyenne ; ils présentent à la périphérie une zone saillante en forme de bourrelet circu-

laire, munie à l'extérieur d'une frange ininterrompue de longs cils vibratiles. Tout comme le pôle glandulaire de l'urne, la surface de ces disques ciliés est parsemée de grains minuscules, colorables *intra vitam* par le rouge neutre et particulièrement abondants au niveau du bourrelet périphérique ; à la base de chaque cil, un bâtonnet également colorable par le rouge est implanté normalement à la circonférence. Un noyau, entouré de granulations érythrophiles serrées, est situé en un point de la

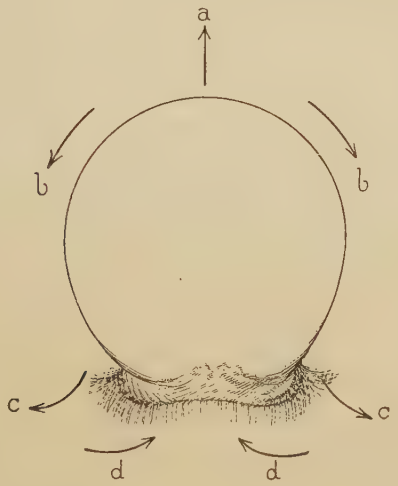


Fig. 1. — *Figure schématique* indiquant le sens du mouvement de progression de l'urne *(a)* ; le sens du glissement des particules en suspension dans le liquide et refoulées par le pôle postérieur de l'urne *(b)* ; le sens dans lequel les hématies propres de l'animal sont rejetées loin du centre d'attraction ciliaire *(c)* ; le sens du courant tourbillonnaire qui entraîne les particules étrangères au centre du pôle glandulaire de l'urne *(d)*.

périphérie. Ces éléments se déplacent dans le liquide avec une certaine lenteur. Ils ne sont autre chose que la portion glandulaire de l'urne détachée et devenue indépendante par suite de la dégénérescence du corps de cette dernière ; ils sont constitués par l'ensemble de la calotte cytoplasmique qui coiffe le pôle postérieur. de l'urne, y compris le noyau, la portion vésiculeuse se détachant et flottant à l'état de loque ridée, plus ou moins vidée de son contenu (planche XII, fig. 1, 2, 3, 4). L'on verra plus loin que le découronnement des urnes accompagne très souvent la lyse de

ces éléments ; on peut facilement en suivre toutes les étapes lorsque l'on mélange *in vitro* avec l'antigène le sang d'un animal immunisé. Devenu libre dans le plasma, n'étant plus comprimé par le corps de l'urne, sollicité dans le liquide ambiant par des forces égales appliquées normalement à sa surface et en vertu de son élasticité propre, le bourrelet cilié de l'urne s'étale, s'aplatit, prend une forme strictement circulaire et vit encore pendant quelque temps d'une vie indépendante.

En dedans du bourrelet cilié, la surface de ce disque est occupée par une sorte de mosaïque cellulaire disposée en une seule couche, à la façon d'un endothélium pavimenteux. Les cellules composant cette mosaïque ne sont autres que les hématies du siponcle, étalées à la surface du disque, étroitement juxtaposées, devenues polygonales par compression réciproque, et finalement reconnaissables à leur noyau et à leurs inclusions pyroninophiles. Çà et là, entre les éléments de ce dallage cellulaire, des amibocytes granuleux rampent. C'est qu'en effet, au fur et à mesure que se produit la lyse de l'urne, les hématies du siponcle cessent d'être écartées et tenues à distance par le jeu des cils ; elles s'engagent dans l'entonnoir cilié et viennent adhérer à sa surface. Il n'est pas impossible qu'au moment où s'accomplit cette transformation le signe de la charge électrique de l'urne se modifie également et que le disque cilié libre soit d'un signe différent de celui de l'urne intacte. Cette hypothèse, qui reste à vérifier, pourrait bien s'appliquer aux autres éléments du sang lorsqu'ils viennent à dégénérer.

Quand on mélange, *in vivo* ou *in vitro,* au liquide cavitaire du siponcle une suspension de particules étrangères (bactéries, globules rouges de mammifères, carmin, encre de Chine, etc.), ces particules sont rapidement happées par le pôle glandulaire des urnes fixées à lui et constituent, en s'agglomérant, de longues traînées qui souvent dépassent de beaucoup la longueur de l'urne et que cette dernière charrie ainsi à sa suite après en avoir débarrassé le milieu ambiant (planche VIII, fig. 1). Ce phénomène de l'agglutination des particules étrangères par l'urne doit nous arrêter un moment. L'étude de son mécanisme est des plus curieuses et des plus suggestives.

Les urnes avancent avec une grande rapidité, le *pôle non cilié en avant,* et refoulent les éléments de toutes sortes en suspension dans les liquides et qu'elles rencontrent sur leur trajet ; le long de la surface sphérique, distendue et polie de l'urne, ces particules glissent d'avant en arrière sans y adhérer aucunement et

parviennent ainsi jusqu'au voisinage de son pôle postérieur, *dans la zone d'action des cils.*

Notons ici qu'en avançant au milieu de la masse souvent assez compacte des cellules sanguines, l'urne creuse derrière elle un long sillage très facile à distinguer au microscope ; l'aspiration produite à ce niveau vient s'ajouter aux causes diverses qui assurent la fixation des corpuscules au pôle postérieur de l'élément mobile. Les cils battent l'arrière et déterminent un tourbillon en entonnoir qui tend à rassembler les particules en suspension au centre du bourrelet cilié. *Et cependant toutes ne s'y rassemblent pas.*

En effet, arrivées au niveau de la zone d'attraction, il se produit brusquement une séparation entre les hématies propres de l'animal et les particules étrangères : les premières sont instantanément, brutalement rejetées en dehors, et là tourbillonnent à une faible distance du bourrelet sans jamais pouvoir s'en rapprocher, comme maintenues rigoureusement à l'écart par une force répulsive. Au contraire, les secondes, à l'inverse de ce qui se passe pour les hématies du siponcle, sont attirées vers l'entonnoir et y tombent avec une vitesse extraordinaire ; elles y adhèrent aussitôt fortement (planche VII, fig. 1).

L'urne ne tarde pas, de la sorte, à traîner derrière elle une longue queue composée d'éléments agglutinés dont la longueur va rapidement croissant. Cette queue, bien que dépassant souvent de beaucoup par sa longueur la zone d'action des cils, n'en continue pas moins à être le siège d'une puissante action attractive vis-à-vis des particules étrangères qui viennent se précipiter avec une vitesse énorme sur les côtés ou à l'extrémité de l'amas déjà formé. Parfois, la particule attirée, tant son élan est énergique, est entraînée par la vitesse acquise et, ayant touché l'amas agglutiné, y rebondit, prend la tangente et s'évade brusquement. Mais c'est là l'exception. La plupart des cellules sanguines sont soumises à l'action répulsive qui les maintient à distance du pôle agglutinant de l'urne ; à part les hématies, les cellules sexuelles, et, parmi les amibocytes, les éléments à grosses sphérules amphophiles sont tenus à l'écart. Les amibocytes douées de pouvoir phagocytaire font exception ; sans être précipitées à la surface de la masse agglutinée avec la violence des particules étrangères, elles n'en sont point écartées ; et, comme on le verra plus loin, elles y pénètrent sans difficulté et adhèrent bientôt au disque cilié. Presque constamment, il y a un bouquet, petit ou grand, de phagocytes accolés à ce disque.

Voilà un ensemble de phénomènes d'un caractère bien particulier. S'il n'y avait, dans cet accolement à l'urne, qu'une aspiration due au vide creusé par le mouvement tourbillonnaire, tous les éléments en suspension dans le liquide devraient subir un sort identique. Or, nous venons de voir qu'il n'en est rien.

La sélection effectuée d'une manière aussi rigoureuse entre hématies propres et particules étrangères, la répulsion constante des premières, la vitesse avec laquelle les secondes sont entraînées jusqu'au pôle postérieur de l'urne, la propagation de cette force attractive jusqu'à l'extrémité de la masse agglutinée, et, par dessus tout, l'instantanéité avec laquelle s'accomplissent ces temps divers, tout cela impose l'idée de forces électrostatiques en jeu.

Afin de contrôler la valeur de cette hypothèse, nous nous sommes proposés, avec Vlès, de déterminer au moyen de la méthode de la cataphorèse le signe de la charge électrique des diverses cellules du liquide cavitaire dans leur milieu normal, et comparativement, celui des particules étrangères agglutinées par les urnes. Pour vérifier ce dernier point, nous nous sommes servi de globules rouges de mouton lavées et mises en suspension dans l'eau de mer.

La cataphorèse a été réalisée dans des tubes en U, ou plutôt coudés, analogues aux dispositifs classiques (Michaelis), mais renversés, ouvertures en bas. Nos tubes coudés mesuraient 21 centimètres de *A* en *B*. Sur les branches montantes, deux robinets en verre, *C* et *D*, peuvent interrompre la communication entre la portion *C, O, D* contenant le liquide à examiner et le pied des deux branches. L'espace *C, O, D* a une capacité de 2 centimètres cubes environ.

Pour faire une détermination, on remplit de sang de siponcle l'espace *C, O, D*, en dépassant un peu la limite marquée par les robinets. On expulse les bulles d'air, on ferme les robinets, on rince à l'eau de mer *A, C* et *B, D* ; on les remplit d'eau de mer, on ferme avec un tampon d'ouate hydrophile *(Aa, Bb)* en ménageant les espaces *aC, bD* remplis d'eau de mer, les tampons d'ouate assurent la liaison entre les électrodes et le tube à cataphorèse. Des électrodes impolarisables sont réalisés par des bâtons de Zn plongés dans une solution de $Zn\,Cl^2$ (+) et de Cu plongé dans une solution de $CuCl^2$ (—).

On a par conséquent la chaîne suivante : (+) bâtons de Zn ; solution de $Zn\,Cl^2$; tampons de coton mouillés d'eau de mer ; ampoules d'eau de mer ; robinets ; sang de siponcle ; robinets ;

ampoules d'eau de mer ; coton mouillé d'eau de mer ; solution de $Cu\,Cl^2$; bâtons de Cu (—).

Il est important de n'introduire dans l'appareil qu'un sang relativement pauvre en éléments cellulaires. Pour cela, après la saignée de l'animal, on laisse la sédimentation se faire ; on emploie la portion supérieure, claire, de la colonne sanguine renfermant les urnes, à laquelle on ajoute une petite quantité d'hématies de siponcle.

Au point de vue électrique, la cataphorèse a présenté un opti-

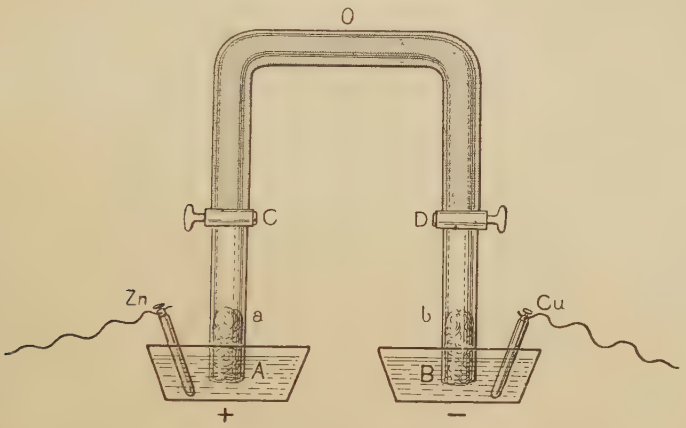


FIG. 2. — *Dispositif pour l'étude de la cataphorèse.*
Le tube coudé *A, O, B* porte en *C, D* deux robinets. La portion *C, O, D* est remplie du liquide cavitaire à étudier ; les portions *A, C* et *B, D* sont remplies d'eau de mer ; les tampons de coton *Aa* et *Bb* font la liaison avec les électrodes. *Cui* = électrode cuivre à la cathode ; *Zn* = électrode zinc à l'anode. Une fois le courant produit et les robinets *C, D* ouverts, on recueille au bout d'un certain temps les dépôts de cellules formés en *(a)* et *(b)*.

mum d'efficacité pour une chute de potentiel de l'ordre de deux volts par centimètre environ ; des valeurs plus fortes aboutissent à un échauffement très rapide des suspensions (conductibilité élevée de l'eau de mer), accompagné de phénomènes de lyse cellulaire intense ; les champs trop faibles, en raison de la lenteur avec laquelle s'effectue le transport, permettent la sédimentation des particules lourdes indifféremment aux deux pôles.

Quand l'expérience commence, on ouvre les robinets et le courant s'établit. A ce moment, un petit nombre d'éléments tombent aux deux pôles, sur le coton, en vertu de leur propre poids. Il est évident que, malgré le temps relativement court de

l'expérience, un tel phénomène est impossible à éviter complètement. Il faut noter néanmoins que les cellules transportées par le courant ne demeurent pas seulement à la surface du coton, mais s'y enfoncent profondément, ce qui n'arrive pas pour les éléments simplement sédimentés. Il est bon de ne pas prolonger le passage du courant pendant plus d'une heure à cause des phénomènes tardifs de lyse.

Les résultats globaux observés au cours d'expériences renouvelées en faisant varier les conditions expérimentales ont été les suivants.

A) *Eléments normaux du siponcle.* — Les hématies du siponcle se réunissent à la cathode ; elles ont donc une charge positive.

Il en est de même des urnes libres. On ne trouve jamais trace de celles-ci à l'anode.

Les amibocytes hyalins, de même que ceux, à fines granulations éosinophiles (c'est-à-dire les phagocytes), se comportent comme pratiquement neutres ; on les trouve indifféremment aux deux pôles, ainsi que dans la branche transversale de l'appareil. Quant aux amibocytes à grosses sphérules amphophiles (qui ont perdu toute fonction phagocytaire), elles sont transportées comme les urnes et les hématies à la cathode.

Les vésicules, énigmatiques elles aussi, sont pratiquement neutres ; les formes jeunes, à un et deux noyaux, se trouvent indifféremment aux deux pôles ; les formes âgées restent dans la branche transversale (peut-être en raison de leur poids).

La substance protéique, dissoute en petite quantité dans le liquide cavitaire, flocule rapidement à la cathode.

Voici, à titre d'exemple, le protocole d'une expérience :

Expérience I. — Sang de siponcle normal introduit dans le tube à cataphorèse. Au bout de trois minutes, début de floculation au pôle négatif. Rien à l'anode. Au bout d'une heure : à la cathode, dépôts roussâtres abondants ayant pénétré profondément dans le coton de liaison. A l'anode, très légers dépôts roussâtres n'ayant pas pénétré dans le coton.

Examen microscopique des ampoules polaires et du tube horizontal. Cathode. — Purée d'hématies, dont un certain nombre sont altérées, lysées et réduites au stroma ou même aux inclusions ; très nombreux amibocytes à grosses granulations réfringentes ; peu d'amibocytes à granulations fines. Assez nombreuses vésicules énigmatiques d'aspect normal. Beaucoup d'urnes, la plupart altérées et réduites à l'état de haillons ; nombreux disques ciliés provenant de la destruction sur place des urnes. Les mouvements des cils sont arrêtés. Paquets d'amibocytes détachés des urnes.

Anode. — Rares hématies, en général non lysées. Quelques ovules jeunes. Masses de vésicules énigmatiques agglutinées entre elles. Amibocytes à fines granulations moyennement nombreuses. Aucun amibocyte à grosses granulations amphophiles. Pas d'urnes ou de débris d'urnes.

Branche horizontale. — Sur la paroi sont collés des amas qui sont constitués par un enchevêtrement d'urnes encore animées de mouvements ciliaires, de vésicules énigmatiques, de disques ciliés, d'amibocytes à grains fins et d'amibocytes hyalins. Ces complexes cellulaires qui, dès le début, avaient adhéré à la paroi de verre, n'en ont plus bougé.

B) *Cataphorèse des éléments étrangers.* — Dans nos expériences, il s'agit de globules rouge de mouton. La cataphorèse de ces globules en suspension dans l'eau de mer ont montré qu'elles ont dans ce milieu (de pH = 8,1) une charge négative et vont à l'anode. Ceci est d'accord avec ce que l'on pouvait prévoir d'après les travaux antérieurs sur la cataphorèse des hématies. Henri et M^me^ Girard-Mangin (1904), Girard (1912), ont montré que, pour les milieux iso-électriques usuels de pH légèrement plus faible que l'eau de mer, les hématies de mammifères ont une charge négative.

Mises dans le même milieu d'eau de mer (ou de plasma de siponcle, qui en diffère très peu), les hématies de mouton vont prendre les propriétés inverses de celles de certains éléments normaux du siponcle. Cette inversion pourrait, *a priori*, expliquer la captation sélective des globules de mouton par les urnes de signes contraires. C'est ce que va nous démontrer la cataphorèse d'un mélange de sang de siponcle et de globules de mouton.

En effet, en soumettant ce mélange à la cataphorèse, on constate avec la plus grande netteté le transport des hématies des siponcles au pôle négatif et celui des globules de mouton à l'anode. Quant aux urnes, qui, dans les expériences précédentes, avaient une polarité absolument évidente, on ne les décèle plus à aucun pôle, mais on les retrouve toutes déposées sur la paroi de la branche horizontale intermédiaire ; elles n'ont subi aucun transport. Or, toutes portent à leur pôle postérieur une masse compacte de globules rouges de mouton agglutinées au moment de la confection du mélange. L'agglutination a donc empêché la réponse au gradient du potentiel.

A première vue, ces champs polaires semblent être de valeur sensiblement égale comme volume. On fait la numération sous le microscope des globules rouges contenus dans les charges de dix urnes prises au hasard ; pour cela, on écrase légèrement

l'urne sous l'objectif à immersion, la charge se dissocie et peut être évaluée assez exactement. On trouve que le nombre d'hématies accolées par l'urne s'écarte très peu d'une moyenne et peut être considéré comme sensiblement constant. L'ordre de grandeur est le même pour tous et varie entre les extrêmes 84 et 99, la moyenne étant de 91,2. *Il est donc probable que les urnes normalement positives ont été quantitativement neutralisées par les globules de mouton négatifs.* D'où leur absence totale aux deux pôles et leur présence en masse dans la branche horizontale.

Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que, dans l'une de nos expériences, les urnes, étant porteuses d'énormes ballots leucocytaires (conséquence probable d'une infection spontanée), montrèrent, elles aussi, une polarité nulle et ne quittèrent point la branche horizontale de l'appareil à cataphorèse.

Voici le protocole d'une expérience portant sur un mélange de sang de siponcle et de globules rouges de mouton :

Expérience II. — On introduit dans l'appareil le sang d'un siponcle femelle auquel on ajoute un peu d'une émulsion dans l'eau de mer de globules rouges de mouton. Il s'agit d'un siponcle dont le sang avait servi également à l'expérience I.

7 h. 20 : mise en train de l'expérience ; voltage : 15.

7 h. 21 : une minute après le début, on constate à la cathode la formation d'un coagula net.

7 h. 26 : à l'anode, sous le robinet, apparition d'un nuage rougeâtre ; rien au pôle négatif.

7 h. 35 : traînée roussâtre au pôle négatif tendant à s'enfoncer dans la ouate.

8 h. 10 : au pôle négatif, traînée roussâtre pénétrant profondément dans la ouate.

Sur la paroi inférieure de la branche horizontale, dépôt rougeâtre sédimenté.

On arrête l'expérience.

Examen microscopique. — Liquide et dépôt sur la ouate au pôle (—). Purée d'hématies de siponcle ; la grande majorité lysée. Rarissimes globules rouges de mouton. Pas d'urnes ni de débris d'urnes. Amibocytes assez nombreux ; quelques vésicules.

Liquide et dépôt au pôle (+). Masse compacte de globules rouges de mouton. Rarissimes hématies de siponcle. Pas d'urnes ni de débris d'urnes. Amibocytes assez nombreux ; vésicules énigmatiques assez nombreuses.

Sédiment de la branche horizontale. — Masse d'urnes généralement en bon état ; actifs mouvements des cils. Toutes portent une charge de globules rouges de mouton. La numération des globules contenus dans dix charges prises au hasard donnent les chiffres de 98, 84, 94, 91, 93, 87, 93, 85, 88, 99, ce qui donne par charge une moyenne de 91,2.

Le sédiment comprend encore, outre les vésicules énigmatiques et les amibocytes, de rares hématies de siponcle et de rares globules de mouton, qui sans doute n'ont pas encore eu le temps d'être polarisés.

L'expérience, on le voit, est d'une netteté presque schématique.

Il résulte de l'ensemble des données précédentes que des facteurs électrostatiques interviennent dans le triage, par les urnes, des particules en suspension dans le liquide cavitaire des siponcles ; tandis que les hématies propres de l'animal, de même signe que les urnes, sont maintenues à distance du tourbillon créé par le peu des cils, l'attraction s'exerce, au contraire, sur les hématies étrangères de signe inverse. Celles-ci viennent s'accoler au complexe urnes-globules de mouton jusqu'au moment où le quantum de neutralisation est atteint. Tant que ce quantum n'est pas encore réalisé, la somme des charges du complexe est encore positive et l'agglutination reste possible. Notons encore ce fait que, tout comme les hématies propres du siponcle, les amibocytes non douées de la propriété phagocytaire sont de même signe que les urnes et sont rejetées par celles-ci. Au contraire, les phagocytes qui doivent pénétrer dans l'intérieur de la masse agglutinée, les vésicules énigmatiques qui jouent un rôle si important dans l'accolement des masses agglutinées les unes aux autres, tous ces éléments si nécessaires et qui, dans l'intérêt de la défense, ne doivent pas faire défaut au moment où les processus de résorption entrent en jeu, sont pratiquement neutres et ont facilement accès jusqu'aux amas cellulaires sur lesquels va s'exercer l'action phagocytaire. Il y a là un admirable exemple d'adaptation cellulaire à la protection de l'organisme. Or, l'on sait que les bactéries, elles aussi, dans les conditions biologiques, portent le plus souvent une charge négative. Il est assez probable que le phénomène que nous venons de décrire dans le cas bien particulier du siponcle présente dans la série des êtres vivants, une importance que nous commençons à peine à soupçonner.

Quelle est la source de cette production continue d'énergie électrique ? Il est assez vraisemblable qu'elle est d'origine mécanique et qu'il faut la chercher dans le frottement ininterrompu des cils entre eux; c'est également par l'extrémité de ces derniers que l'électricité produite s'écoule sans relâche dans le milieu ambiant et influence les particules voisines. C'est dans le plan même où est situé le faisceau antérieur des cils que s'opère la répulsion des hématies propres de l'animal, suggérant assez

bien, nous l'avons dit, le phénomène du « vent électrique ». Il est probable que l'abondante sécrétion visqueuse émise au pôle postérieur de l'urne et qui s'étend dans le milieu ambiant aussi loin que s'étend le paquet d'éléments agglutinés, est électrisée elle-même et que sa charge est de même signe que celle de l'urne.

L'urne semble garder à peu près intactes ses propriétés électriques tant qu'elle conserve ses cils et tant que le disque cilié ne s'est pas détaché du reste de l'élément. Lorsque l'on soumet l'urne à l'action d'une substance tricholytique (sérum d'*Eupagurus Pridcauxii,* sérum de Maia immunisée contre le sang de siponcle), les cils continuent à repousser les hématies propres jusqu'à tricholyse complète. Quant aux disques ciliés, une fois détachés, l'on a vu qu'ils fixaient solidement à leur surface les hématies au lieu de les repousser. Il est vraisemblable que le signe de la charge s'est inversé au moment où la séparation a eu lieu. Ainsi donc, le phénomène de l'agglutination est dû à l'action combinée du tourbillon ciliaire et de l'attraction électrique. La sécrétion visqueuse de l'urne vient s'ajouter à cette double action. L'urne émet, par son pôle glandulaire, lorsque celui-ci vient à être excité, une sécrétion muqueuse très abondante qui englue les éléments fixés à sa surface et cimente cette masse, dans laquelle les phagocytes ne vont pas tarder à pénétrer. Cette sécrétion, chez l'animal normal, est facilement rendue visible par les colorants après fixation. Chez l'animal immunisé, son abondance et sa viscosité sont telles, qu'elle se présente sous forme d'un énorme panache glaireux et tremblotant que l'urne charrie derrière elle et qu'il est très facile de voir sans coloration aucune. Il est certain que l'atmosphère visqueuse dont cette sécrétion imprègne et enveloppe la masse agglutinée joue un rôle considérable dans l'accolement les uns aux autres des amas détachés et dans la formation des corps bruns.

Cette sécrétion muqueuse est d'une acidité prononcée qui augmente considérablement chez les individus immunisés. Cette constatation a été faite par M^lle^ A. Damboviceanu et M. Rapkine. Les indicateurs employés pour cette étude ont été le rouge de phénol et le bromo-crésol pourpre en solution à 2,5 % dans l'eau distillée. Chez le siponcle normal, le pH de la sécrétion muqueuse est sensiblement égal à 6, alors que chez les mêmes animaux la plasma est de pH = 7,65, et que le pH intérieur de l'urne (portion vésiculeuse déterminée au moyen de la micro-injection par l'appareil de Chambers) est de 7,4. Cette acidité de la sécrétion muqueuse augmente considérablement chez les vaccinés

(siponcle vacciné par le *B. tumefaciens*), et croît à mesure que l'on s'éloigne de la dernière inoculation vaccinale. Alors que chez les siponcles normaux la réaction de la sécrétion est de pH = 6, elle est devenue de pH = 5,6 sept jours après une première inoculation expérimentale de bactéries, et de pH = 5 quatre semaines après la dernière injection chez des siponcles ayant subi antérieurement des injections multiples. Pendant ce temps, le pH du plasma est resté invariable.

Tel est le mécanisme qui, chez l'animal immunisé, préside à l'agglutination des particules étrangères. C'est là un premier stade de la réaction de défense qui précède et prépare la résorption de ces mêmes particules. Cette deuxième étape sera étudiée dans le chapitre suivant. Notons seulement dès maintenant, et sans insister, que les diverses propriétés que nous venons de signaler chez l'urne sont intensifiées considérablement chez l'animal immunisé. La sécrétion muqueuse est plus abondante et plus épaisse, son acidité s'est accrue ; le pouvoir agglutinant est infiniment plus fort ; le pH intérieur de l'urne s'est fortement modifié dans le sens de l'acidité : d'une réaction très constante chez les siponcles normaux (pH = 7,4), nous l'avons trouvé chez les siponcles immunisés variant entre 5,9 et 5,7. Cette acidité croissante du pH intérieur, ainsi que l'acidification progressive de la sécrétion muqueuse, constituent l'un des traits les plus caractéristiques que présentent les urnes chez l'animal immunisé. Un autre trait non moins caractéristique est la résistance acquise par l'urne elle-même vis-à-vis d'une substance toxique, et cela en dehors de toute intervention étrangère (humeurs ou cellules). Les urnes, comme on le verra dans un autre chapitre, sont excessivement sensibles aux poisons extraits des nématocystes d'*Adamsia Palliata* : une macération de nématocystes introduite dans un tube contenant des urnes les tue très rapidement, avec tricholyse suivie de la fonte de l'élément tout entier. Les urnes normales se montrent incapables de capter et d'agglutiner les nématocystes en suspension dans le liquide où elles nagent. Au contraire, les urnes provenant d'individus qui ont subi à plusieurs reprises des injections de nématocystes d'Adamsia sont devenus absolument réfractaires au poison de ces dernières : mélangées *in vitro* à une suspension de ces nématocystes, elles les agglutinent et les fixent activement à leur pôle postérieur ; de plus, le poison des cellules urticantes a perdu tout pouvoir lytique sur ces urnes vaccinées. C'est là un bel exemple d'immunité acquise par une cellule.

Signalons enfin que, chez les urnes appartenant à l'animal immunisé, on constate l'apparition de propriétés lytiques des plus nettes : les bactéries agglutinées dans la sécrétion muqueuse y subissent la transformation granulaire et la lyse sans intervention d'autres éléments cellulaires ; s'il s'agit de siponcles ayant été antérieurement soumis à des injections répétées de globules rouges de mouton, ces derniers sont hémolysés par la sécrétion de l'urne. Ces propriétés lytiques font défaut chez les urnes normales. Enfin, lorsque l'on émulsionne dans le plasma de siponcle normal le produit obtenu en broyant dans un mortier des urnes immunisées, on constate, après centrifugation, que le liquide a acquis des propriétés bactériolytiques énergiques vis-à-vis de la bactérie qui a servi d'antigène. Le broyage d'urnes normales ne donne lieu à aucune constatation analogue.

Les urnes, épuisées par une suractivité excessive, disparaissent du liquide cavitaire. On en retrouve les restes incorporés aux corps bruns de la cavité générale. Chez les siponcles normaux, l'urne, avec sa charge de particules agglutinées, ne tarde pas à s'agglutiner elle-même à des complexes cellulaires semblables de plus en plus volumineux ; là, elles dégénèrent ; le contenu du corps fait hernie en différents points de la surface, sous forme de boules réfringentes expulsées au dehors ; le corps flétri se plissote, se réduit de plus en plus. Le disque cilié seul persiste quelque temps, il ne tarde pas à être entouré lui-même de phagocytes qui l'ensevelissent au centre d'un vaste plasmodium à l'intérieur duquel il subit la digestion intracellulaire. Tel est, en général, le mode de disparition de l'urne fatiguée et hors d'usage (planche XVIII, fig. 1). C'est surtout chez l'animal immunisé qu'il est instructif de suivre le processus de disparition de l'urne ; là, en effet, l'inoculation d'une nouvelle dose d'antigène provoque une lyse rapide et massive qu'il est aisé de suivre *in vitro*. Cette lyse se produit sitôt que l'urne a subi le contact de l'antigène (bactéries ou globules rouges de mouton) ; elle se manifeste par la formation de voiles muqueux en suspension dans le liquide, par l'accolement des urnes aux vésicules énigmatiques, par la résorption à l'intérieur de cellules géantes des disques ciliés qui, eux, échappent à la lyse. Ces trois aspects différents d'un même processus peuvent se combiner entre eux de mille manières.

Sitôt que l'urne immunisée a réalisé sa charge de bactéries et d'amibocytes, son corps subit, dans le plasma même, une véritable fonte. Le corps se vide, s'allonge, diffuse dans le milieu

ambiant, le bourrelet cilié demeurant seul intact. La substance muqueuse lysée se répand en nappes, se fusionne avec des nappes analogues émanées d'urnes voisines et forme ainsi de véritables voiles qui flottent à la façon de draperies dans le plasma (voir planche XIII). Les voiles que l'on voit de la sorte se balancer dans les tubes contenant du sang de siponcle immunisé ne se forment guère dans le sang du siponcle normal et sont constitués exclusivement par le produit de la lyse des urnes. Les vésicules énigmatiques n'y prennent point de part. Les replis de ce voile englobent des amibocytes, le plus souvent chargés de bactéries phagocytées. L'accolement des urnes se fait par *l'adhérence de l'urne au rebord d'une vésicule énigmatique adulte*. Cette prise de contact peut s'effectuer de deux manières: tantôt c'est le corps de l'urne en train de subir la fonte qui s'aggripe fortement à la vésicule elle-même, recouverte de substance visqueuse qu'elle secrète (planche XI, planche XIV, fig. 1) ; tantôt l'accolement se fait par l'intermédiaire de la masse amibocytaire agglomérée au pôle glandulaire de l'urne (planche XIV, fig. 2). L'on verra plus tard l'analyse détaillée de ce phénomène. Quant aux disques ciliés qui, à la surface des amas, persistent après la fonte de l'urne, ils sont bientôt englobés, avec leur charge de bactéries et d'amibocytes à l'intérieur, d'énormes plasmodia multinucléés (planche XVIII, fig. 1). Au cours de ce processus, des filaments issus de l'urne en voie de lyse s'anastomosent, s'entrecroisent, forment de véritables réseaux qui traversent les conglomérats cellulaires sous forme de travées d'apparence fasciculée ; au premier abord, on pourrait les prendre pour des filaments de fibrine. En réalité, ils ne présentent pas les caractéristiques de la fibrine, ne se colorent point par la méthode de Weigert et se colorent par le muci-carmin en rouge vif. Il s'agit là d'une substance élaborée par l'urne et appartenant au groupe des mucines.

L'on verra ailleurs que cette fonte des urnes chez les individus immunisés contribue puissamment à modifier le milieu humoral. il s'agit là d'un processus assez comparable à un phénomène de fonte glandulaire se produisant au contact d'un excitant spécifique. Il a pour conséquence de créer au voisinage immédiat de l'élément en voie de lyse une zone de diffusion à l'intérieur de laquelle les conditions humorales, et par conséquent les réactions d'immunité, se trouvent profondément modifiées.

Nous avons insisté surtout sur la fonction agglutinante et agglutinogène des urnes, l'étude des réactions de défense faisant

l'objet de ce travail. Nous rappelons qu'à côté de cette fonction importante, qui a pour résultat le balayage des particules étrangères immigrées dans le liquide cavitaire, les urnes accomplissent également un rôle de brassage des humeurs particulièrement important en vue d'assurer l'hématose. Bien des auteurs ont relevé le fait. Nous n'y insisterons pas.

f) **Vésicules énigmatiques.** — On connaît ces curieux éléments multinucléés, de dimensions très variables, dépourvus de mouvements propres, qui flottent dans le liquide cavitaire des siponculides et auxquels Cuénot a donné le nom de vésicules énigmatiques. Ce sont des vésicules, en effet, ou plutôt des capsules discoïdes, à bords festonnés, biconvexes, à surface mamelonnée, revêtue sur les deux faces, lorsqu'elles ont atteint leur taille limite, d'une véritable mosaïque de cellules dont le noyau est entouré d'un cytoplasma disposé radiairement. Ces deux faces délimitent un espace rempli d'une substance amorphe, visqueuse, coagulable par l'alcool et l'éther, se colorant en rose vif par la solution de Giemsa. Il s'agit ici certainement d'un contenu de nature albuminoïde. Les vésicules adultes peuvent atteindre jusqu'à 500 μ de diamètre, alors que la surface des éléments uninucléés jeunes ne dépassent guère plus de deux fois celle d'une hématie normale. Sur une coupe transversale (planche XX, fig. 2), la vésicule adulte présente la forme générale d'un fuseau allongé; son revêtement endothélial se compose de cellules volumineuses, parfaitement distinctes, très régulières de forme, les unes aplaties, les autres plus ou moins cuboïdes, et laissant parfois entre elles un écartement assez marqué ; elles sont implantées sur une sorte de membrane basale résultant peut-être simplement du fusionnement du pied des cellules de revêtement, restes du syncytium primitif. Vers les extrémités du fuseau (c'est-à-dire sur le bord festonné du disque), les corps cellulaires s'écartent, en sorte qu'à ce niveau le contenu de la capsule n'est plus séparé du milieu extérieur que par la faible épaisseur de la membrane basale.

Les interstices des cellules de revêtement ne sont bien nettes que dans les vésicules adultes de forte taille. Dans les cellules plus jeunes, ce revêtement se compose d'un syncytium parsemé de noyaux entourés de cytoplasma étoilé avec, çà et là, à la surface, des sillons ébauches de contours cellulaires. Dans les vésicules traitées *intra vitam* par le rouge neutre, on voit la matière colorante se fixer exclusivement sur les petits grains qui entourent

immédiatement le noyau. Ces vésicules sont d'une consistance et en même temps d'une élasticité très prononcées ; on ne peut les écraser entre lame et lamelle, elles rebondissent et échappent à la pression en glissant; on n'arrive pas à les déchirer au moyen des aiguilles à micro-dissection de l'appareil de Chambers.

On trouve fréquemment, sous le revêtement épithélial, des formations allongées, aciculées, d'apparence cristalloïde, de morphologie, de taille et de fréquence très variables.

Ces éléments se présentent fondamentalement sous forme de fuseaux très minces, allongés et à extrémités aciculées, de longueur et d'épaisseurs diverses, et que l'on rencontre tantôt à l'état isolé, tantôt associés en paquets, en faisceaux de toutes formes et de toutes dimensions, qui, par suite de la juxtaposition des éléments primitifs, prennent souvent un aspect fibreux (voir planche XXI). Ces cristalloïdes sont déformables par les actions mécaniques ; la compression leur fait prendre les aspects ondulés ou digités les plus divers. M^lle^ A. Damboviceanu a pu déterminer quelques-uns des caractères de ces cristalloïdes : ils sont insolubles dans l'eau distillée, ils fondent par chauffage vers 55° ; les acides et les bases les font disparaître après gonflement ; la trypsine ne les attaque pas, même après une action prolongée. Ils sont très solubles dans le chloroforme, l'éther et l'alcool à chaud. Il est certain qu'il ne s'agit pas là de cristaux minéraux. Il est certain également que nous n'avons pas affaire à des éléments de nature protéique ; ils appartiennent probablement au groupe des lipides. Ajoutons que le rouge neutre ne les colore pas et qu'ils se colorent en violet clair par la méthode de Weigert. La solution de Lugol ne les modifie en rien.

Ces formations cristallines ne se rencontrent jamais dans les vésicules jeunes, mais seulement dans les éléments adultes. Elles sont peu nombreuses à l'état normal, mais apparaissent en grand nombre lorsque les vésicules entrent en activité fonctionnelle, par exemple vers le troisième jour d'une inoculation expérimentale, alors que les complexes cellulaires commencent à se déposer sur les parois du cœlome. Un changement brusque dans l'équilibre physique des humeurs détermine également une apparition instantanée et massive de ces formations à l'intérieur de vésicules qui, quelques instants auparavant, n'en contenaient pas. Cette cristallisation rapide accompagne l'agglutination des vésicules entre elles. C'est ainsi que, si l'on filtre sur papier le sang d'un siponcle dont les vésicules énigmatiques sont à peu près dépourvues d'inclusions cristallines, on trouve que le caillot

recueilli sur le filtre est formé par l'empilement de ces éléments, bourrés de cristalloïdes de toutes formes et de toutes dimensions.

L'on ignore complètement la signification de ces cristalloïdes. Mais il est certain qu'ils doivent jouer un rôle important dans la vie et le fonctionnement des vésicules.

On trouve toujours dans le sang, à côté des vésicules adultes, des formes jeunes à un ou deux noyaux; à certains moments, l'on assiste à une multiplication rapide de ces éléments : c'est ainsi que, vers la fin des infections, au moment où se constituent les conglomérats amibocytes-urnes-vésicules, le liquide cavitaire est envahi par ces formes jeunes, et cela aussi bien chez l'animal vivant que dans le sang conservé *in vitro*. Aux dépens de quels éléments prennent-elles alors naissance ? L'étude du sang *in vitro* va nous permettre de résoudre ce problème. Si l'on recueille le sang d'un siponcle qui, trois heures auparavant, a reçu une injection de *B. tumefaciens*, on constate qu'après deux heures de séjour *in vitro* le liquide est envahi par une quantité absolument colossale de vésicules énigmatiques jeunes à un seul noyau, les plus petits ne dépassant pas beaucoup la taille d'une hématie (voir planche XIX). Il n'en existait pas, ou guère, dans le sang fraîchement retiré de l'organisme ; elles ont dû, par conséquent, prendre naissance aux dépens de quelque élément préexistant dans le sang.

Ces vésicules jeunes à un seul noyau périphérique s'accroissent et présentent de nombreuses formes de division, en deux et en trois; celles-ci représentent à coup sûr une forme incomplète de la division en quatre, chaque cellule se divisant pour son propre compte plus ou moins rapidement, les unes étant encore au stade 1, alors que d'autres sont déjà au stade 2. Tous les passages existent entre ces formes jeunes et les formes à six, huit, dix noyaux ou davantage, sans que la limite entre le cytoplasma qui entoure ces noyaux soit encore bien marquée. Ce syncytium, dont nous avons parlé plus haut, est la forme de revêtement que l'on rencontre le plus communément dans le plasma de siponcle.

A un certain moment, dans les vésicules de très grande taille, il se fait autour des noyaux du syncytium une individualisation des cytoplasmes cellulaires, et c'est alors que l'on a affaire à ces formes géantes dont le revêtement est constitué par un dallage de cellules bien différenciées, plus ou moins polygonales, et laissant souvent entre elles des espaces linéaires appréciables (planche XIX, fig. 1 et 6).

Ces cellules se détachent à un moment donné et donnent naissance aux vésicules énigmatiques jeunes à un seul noyau.

Les vésicules énigmatiques jeunes sont donc issues de la division du syncytium de revêtement des grandes vésicules âgées. Les vésicules âgées en voie de division sont bourrées d'éléments cristalloïdes grands et petits : ceux-ci ne passent jamais dans les vésicules jeunes.

Cette constatation n'exclut pas l'idée que les vésicules jeunes à un noyau peuvent être des dérivés de l'endothélium cœlomique. Mais il est certain qu'au moment où a lieu une surproduction de ces éléments, c'est aux dépens des vésicules âgées qu'elles prennent naissance.

M^lle^ A. Damboviceanu et Rapkine ont pu établir, par la méthode des micro-injections, le pH intérieur des vésicules. Il est de 7,4 chez le siponcle normal, identique par conséquent à celui des urnes; il tend vers une acidité de plus en plus prononcée chez les siponcles immunisés et varie entre 6,9 et 6,1 quatre semaines après la dernière inoculation chez des siponcles immunisés contre *B. tumefaciens*.

Le tableau suivant, emprunté au travail de M^lle^ A. Damboviceanu, résume les données acquises par la micro-injection sur les variations du pH intérieur des urnes et des vésicules.

	pH du plasma	pH interne des urnes	pH interne des vésicules énigmatiques	pH de la sécrétion des urnes
Siponcle normal.	7.6	7.4	7.4	6
Siponcle sept jours après une injection unique.	7.6	7.4	7.4	5.6
Siponcles immunisés. Injection faite quatre semaines après la dernière inoculation vaccinale.	7.6	5.9 5.8 5.7	6.9 6.7 6.1	5

Il y a là une évolution parallèle du pH intérieur des urnes et des vésicules au cours de l'immunisation qu'il est intéressant de noter.

Rappelons ici que les expériences de cataphorèse nous ont

montré que les vésicules énigmatiques, de même que les phagocytes, se comportent comme pratiquement neutres et ne présentent aucune polarité définie.

Quelles sont donc les fonctions de ces éléments si mal connus? Jouent-ils un rôle quelconque dans les processus défensifs de l'organisme ? Telle est la question que nous devons nous poser maintenant.

Constatons d'abord leur tendance à l'agglutination. Nous l'avons signalée plus haut. Un changement brusque intervenu dans l'état de l'équilibre physique des humeurs détermine la précipitation de ces éléments les uns sur les autres. Ils forment alors de véritables caillots, par stricte juxtaposition de leurs surfaces, qui, en raison de leur élasticité, se moulent les unes sur les autres (planche XX, fig. 1). Ce phénomène s'accompagne de l'apparition de nombreux cristalloïdes. Cette tendance des vésicules à l'agglutination réciproque s'exerce également vis-à-vis des amibocytes et des urnes ; mais, pour cela, il faut que certaines conditions particulières interviennent.

A la suite d'une inoculation dans le cœlome de particules étrangères, alors que l'agglutination de ces particules par les urnes est immédiate et que les complexes urnes-amibocytes se constituent dès le début du processus, on ne constate à ce moment, de la part des vésicules, aucune réaction anormale. Mais, deux ou trois jours plus tard, alors que le balayage du liquide cavitaire est achevé et la résorption phagocytaire très avancée, des manifestations d'activité nouvelles apparaissent dans les vésicules. Une formation abondante de cristalloïdes se produit dans les éléments adultes; des vésicules jeunes commencent à apparaître en grand nombre; les amibocytes ont une tendance manifeste à s'accoler à eux et à ramper à leur surface. Il y a évidemment modification dans la viscosité de ces éléments. C'est à ce moment que se constituent dans le cœlome les conglomérats volumineux résultant de l'accolement, les uns aux autres, des complexes urnes-amibocytes. Ici interviennent les vésicules; elles s'accolent aux masses cellulaires, les cimentent entre elles, constituent l'armature des gros ballots ; elles se lysent partiellement à l'intérieur de ces derniers et les imprègnent d'une atmosphère visqueuse dans laquelle d'autres amas ou des cellules sanguines hors d'usage viennent se prendre (planche XVIII, fig. 2). Les vésicules prennent de la sorte une part active des plus importantes à la constitution des corps bruns, terme final du balayage incessant qui s'opère dans le liquide cœlomique. Très souvent, les vésicules

sont elles-mêmes le point de départ des agglomérations cellulaires : elles s'agglutinent entre elles, ainsi qu'il a été dit plus haut ; au point d'intersection de leurs circonférences, les amibocytes, avec leur contenu phagocytaire, viennent s'accoler et former des amas qui croissent rapidement et finissent par envelopper l'armature vésiculaire tout entière (planche XXII) ; les urnes, avec leur charge, viennent s'y accoler à leur tour et y adhérer soit par l'intermédiaire de l'amas leucocytaire qu'elles traînent à l'arrière, soit directement par leur corps en train de subir la lyse finale (planche XIV, fig. 1 et 2). Soit qu'elles représentent les noyaux autour desquels se forment les corps bruns, soit qu'elles servent de ciment entre les complexes cellulaires préformés, le rôle des vésicules énigmatiques est considérable au moment où se produit le processus final d'élimination des corps étrangers. L'on voit qu'à ce point de vue elles jouent un rôle complémentaire de celui des urnes ; celles-ci captent et agglutinent les particules étrangères ; les vésicules captent et agglutinent les complexes cellulaires eux-mêmes. C'est là une fonction de premier ordre au cours de ce processus compliqué qui a pour résultat de débarrasser sans relâche le liquide cavitaire des particules étrangères de toutes sortes qui y pénètrent à chaque instant. Aussi les vésicules énigmatiques ou leurs débris sont-ils toujours présents, et en grand nombre, dans les corps bruns constitués.

Ce rôle des vésicules énigmatiques est particulièrement actif et précoce chez les siponcles immunisés. On s'en rendra compte lorsque, au cours des chapitres suivants, nous étudierons la formation des caillots chez les siponcles ayant subi des inoculations répétées de bactéries. A ce point de vue, l'étude de l'infection expérimentale par le *B. tumefaciens* est des plus instructives.

De même que les urnes, les vésicules énigmatiques subissent à un moment donné une lyse qui acquiert chez les vaccinés une intensité considérable. Elle s'accomplit généralement à l'intérieur des amas. La vésicule se plisse, s'amincit et s'allonge, prenant de plus en plus l'aspect d'un sac en train de se vider (planche XXIII, fig. 1). De même que chez les urnes, cette expulsion du contenu muqueux crée autour de l'élément en voie de lyse une atmosphère à l'intérieur de laquelle, chez les individus immunisés, les phénomènes de lyse et d'agglutination des particules étrangères s'accomplissent avec énergie, et dans laquelle achève de se conglutiner les phagocytes demeurés jusque-là en dehors des amas. Ces phénomènes peuvent être aisément suivis

par la méthode des lames immergées dans le liquide cavitaire ; on voit à leur surface, lorsqu'il s'agit de sang de siponcle immunisé, l'urne se plisser et s'entourer d'un halo d'une substance diffusée de son intérieur, se colorant en rose vif par l'éosine (méthode de Giemsa).

L'action agglutinante de la substance diffusée est facile à mettre en évidence : il n'y a pour cela, après sédimentation des éléments lourds du sang d'un siponcle immunisé contre le *B. tumefaciens*, qu'à décanter la portion supérieure du liquide, qui contient encore en suspension quelques urnes et quelques vésicules énigmatiques. On y émulsionne des bactéries et on laisse reposer. Le liquide louche ne tarde pas à se clarifier. Si alors on examine le dépôt du fond, on voit que les bactéries sont agglutinées par gros paquets formés les uns au pôle postérieur des urnes, les autres autour des vésicules énigmatiques ridées, réduites, en partie vidées (planche XXIII, fig. 1).

Les substances diffusées hors de la vésicule modifient le milieu humoral chez les vaccinés, ainsi que nous le verrons plus loin. Là encore, les vésicules remplissent une fonction complémentaire de celle des urnes.

Le rôle des vésicules énigmatiques, dans le processus de défense chez les siponcles, n'est donc pas niable. Remplissent-elles dans l'organisme quelque autre fonction ? Cela est fort possible et, en ce qui les concerne, l'énigme n'est pas encore complètement dissipée.

g) **Corps bruns.** — Il s'agit des corps bruns qui, sous forme de grains de dimensions variables, se rencontrent en nombre plus ou moins grand, mais d'une façon constante, dans la cavité générale des siponcles. Leur couleur varie du brun marc de café au jaune verdâtre ; leur taille peut atteindre celle d'un noyau de cerise : c'est l'exception. Il en est souvent qui ne dépassent pas celle d'une tête d'épingle. On les trouve généralement accumulés dans la portion antérieure de la cavité générale, très souvent enclavés entre les tours de spires de l'intestin. Ils sont particulièrement abondants après une infection et surtout après des infections répétées. Ils sont revêtus à l'extérieur d'une sorte de réseau syncytial qui leur constitue une enveloppe fragile formée par les amibocytes de la cavité générale. L'intérieur se compose d'un magma résiduel comprenant les débris divers qui proviennent de l'activité antixénique des cellules sanguines ; ces formations constituent, en effet, le dernier terme du processus d'éli-

mination des corps étrangers immigrés dans la cavité générale ; parmi ces corps étrangers, nous comptons aussi les cellules propres de l'organisme, dégénérées et hors d'usage (hématies, urnes, chloragogènes etc.) : c'est là qu'aboutissent les déchets de la phagocytose, les complexes cellulaires formés au cours d'un processus de défense. C'est un fait remarquable que l'on n'y trouve guère de bactéries, pas plus à l'état normal qu'à la suite des affections expérimentales. Le microscope n'en montre point ; les quelques essais de culture que j'ai faits sont toujours restés stériles. En tout cas, les bactéries y sont fort rares, ce qui n'a pas lieu de nous étonner, étant donné le pouvoir antibactérien que doit posséder ce milieu bourré d'amibocytes, ainsi que de substances provenant de la lyse des urnes et des vésicules énigmatiques. Cela montre à quel point est perfectionné le système de défense si complexe des siponcles.

Les éléments que l'on rencontre le plus constamment à l'intérieur des corps bruns sont : *a)* Des grains de quartz très petits, très nombreux, qui indiquent la fréquence des petites lésions de l'intestin lors de l'ingestion du sable et, comme conséquence, la fréquence probable d'infections bactériennes souvent répétées. *b)* Des concrétions brunes de toutes tailles, issues des chloragogènes, entraînées par les phagocytes, souvent agglomérés sous forme de boules excrétoires. Leur origine est encore mal connue. Ont-elles été toutes entraînées de la cavité générale ? ou ne se sont-elles pas formées partiellement sur place, comme résidu du métabolisme cellulaire finissant ? La question devra être étudiée. Ces concrétions, en nombre énorme, forment la masse principale des gros corps bruns. On les trouve en nombre moins grand dans les corps bruns jeunes, de petites dimensions : d'où l'hypothèse émise plus haut. Elles sont colorées généralement en brun-jaune ou en vert-jaune clair. Très souvent, elles sont incluses dans des débris de cellules (chloragogènes ou amibocytes). *c)* Diverses cellules de l'organisme plus ou moins dégénérées, principalement des hématies et des débris de leucocytes. Les hématies, très nombreuses, sont en général des éléments usagés, parvenus au terme de leur évolution, dont le cytoplasma, après coloration par la méthode Giemsa, est intensément acidophile et dont les inclusions, parfois présentes, manquent la plupart du temps. Les leucocytes abondent, bourrées en général de grosses granulations éosinophiles, enchevêtrées d'une manière inextricable avec les amas de concrétions brunes. *d)* On y rencontre toujours les débris de vésicules énigmatiques réduites à l'état de loques. *e)* Si les bac-

téries font défaut, du moins y trouve-t-on certains parasites : en premier lieu et presque constamment des sporocystes de Grégarines appartenant probablement à l'*Urospora Sipunculi* Kölliker. Ces sporocystes sont libres, isolés, non agglutinés.

Attirons l'attention, en terminant cet aperçu sommaire, sur la confusion regrettable à laquelle peut donner naissance le nom de corps brun appliqué indifféremment aux inclusions brunes intraleucocytaires, si fréquentes chez les invertébrés comme résidu final de la phagocytose, et aux volumineuses formations intracœlomiques que nous venons de décrire.

CHAPITRE IV

SORT DES GLOBULES ROUGES DE MOUTON INJECTÉS DANS LE CŒLOME DE SIPUNCULUS NUDUS. FORMATION D'HÉMOLYSINES

Nous nous sommes servi, pour nos expériences, de globules rouges de mouton lavés et émulsionnés à 1/20e tantôt dans de l'eau de mer pure, tantôt dans de l'eau de mer diluée et ramenée à l'isotonicité pour les globules rouges. Pour réaliser cette dilution isotonique, il suffit, en pratique, de mélanger 100 centimètres cubes d'eau de mer de Roscoff avec 275 centimètres d'eau distillée.

Les doses injectées aux animaux ont varié de 0,25 à 0,75 centimètres cubes. Les animaux inoculés étaient sacrifiés à des intervalles variables. Les observations faites sur l'animal vivant étaient toujours comparées aux observations faites *in vitro*.

Lorsque l'on inocule à un siponcle une émulsion de globules rouges, le premier phénomène apparent qui se produit est l'agglutination en masse de ces éléments par les urnes. Cette agglutination se fait de la même façon, qu'il s'agisse d'urnes libres ou d'urnes fixes situées sur les brides qui relient l'intestin à la paroi du corps. L'on a vu dans le chapitre précédent la rapidité, presque l'instantanéité avec laquelle l'accolement se produit. Notons que si, au lieu de globules rouges de mouton simplement lavés, on inocule des globules rouges préalablement sensibilisés par du sérum antimouton, ces derniers sont agglutinés plus rapidement encore que les premiers : dans ce cas, la queue que l'urne traîne derrière elle croît et atteint son maximum de longueur en quelque minutes. Jamais ces globules sen-

sibilisés ne présentent trace d'hémolyse. D'ailleurs, le plasma normal des siponcles ne possède, vis-à-vis des globules rouges de mouton, aucun pouvoir hémolytique. Les urnes ont tendance à fusionner leur charge avec celles d'autres urnes; l'accolement se fait d'habitude par l'extrémité distale des masses agglutinées, au hasard des rencontres, cependant que les urnes ainsi agglomérées continuent à vibrer et à écarter d'elles les hématies propres de l'animal (planche VIII, fig. 1 et 2).

Sitôt la charge de l'urne constituée, les amibocytes ne tardent pas à y pénétrer. Ce phénomène comprend deux temps : prise de contact de l'amibocyte avec l'amas agglutiné ; pénétration à l'intérieur de la masse. Ce premier contact semble dû, lui aussi, au hasard des rencontres bien plus qu'à un phénomène actif de chimiotactisme. Il se produit, en effet, chez les siponcles anesthésiés à la cocaïne dans la même mesure que chez les individus normaux ; dans le cas des siponcles anesthésiés, il est aisé de suivre *in vitro* l'accolement des amibocytes à la surface de l'amas : ils n'émettent pas de pseudopodes et ne quittent pas l'état quiescent. Une fois l'adhésion produite chez l'animal non anesthésié, le chimiotactisme intervient : l'amibocyte s'allonge, s'effile et tend à pénétrer de plus en plus profondément, en s'orientant vers la base de l'amas, c'est-à-dire vers le pôle glandulaire de l'urne. On peut aisément suivre les changements de forme que présente la cellule amiboïde lorsque l'on mélange au liquide une petite quantité d'une solution de rouge neutre. Les inclusions colorables par cette substance, dont la cellule se charge au cours de sa pénétration dans la masse agglutinée, jalonnent sa marche et permettent de la suivre au milieu des globules rouges incolores (planche X, fig. 1). Ce sont d'abord les amibocytes hyalins qui pénètrent au sein de l'amas; chemin faisant, ils englobent les globules rouges, qui subissent rapidement la digestion intracellulaire ; ces globules phagocytés prennent vivement le rouge neutre. Bientôt on trouve au pôle glandulaire de l'urne des amas compacts d'amibocytes bourrés d'inclusions rouges. Dans le sang examiné sans coloration préalable au rouge neutre, on voit les globules englobés primitivement parfaitement distincts les uns des autres, former petit à petit, à l'intérieur des phagocytes, des amas amorphes de couleur ocre: ce sont les corps bruns intracellulaires (planche III, fig. 8-15).

L'afflux phagocytaire se poursuivant sans relâche, l'amas agglutiné est bientôt envahi et pénétré dans toute sa masse ; les globules rouges agglutinés ne tarderont pas à devenir en totalité la

proie des phagocytes ; ces derniers perdent petit à petit leur individualité cellulaire, fusionnent plus ou moins leurs cytoplasmas et l'urne finit par traîner derrière elle un énorme syncytium englué dans la sécrétion visqueuse de l'élément cilié et au sein duquel on trouve des globules rouges à tous les stades de la digestion intracellulaire. Souvent les masses agglutinées se détachent et tombent dans le liquide ambiant, où elles flottent pendant un certain temps à l'état de ballots qui prennent une coloration d'un brun de plus en plus foncé.

Indépendamment des ballots de phagocytes constitués au contact de l'urne, il se forme toujours, dès le début du processus général, dans le liquide cœlomique, de petits amas d'amibocytes agglutinés entre eux, hérissés de courts pseudopodes épineux chargés, eux aussi, de globules rouges et ne tardant pas à prendre au bout de quelques heures la couleur brune caractéristique des résidus de la digestion intracellulaire. Il s'agit là du phénomène d'agglutination des amibocytes décrit au chapitre précédent, et qui se produit si fréquemment chez une foule d'invertébrés sitôt que les conditions physico-chimiques de l'équilibre viennent à se modifier le moins du monde.

Enfin, un très grand nombre de phagocytes restés libres dans la cavité générale englobent activement des globules rouges ; ces derniers sont toujours enfermés dans de vastes vacuoles intracellulaires qui souvent occupent la presque totalité de la cellule ; beaucoup d'amibocytes se chargent de globules rouges au point de prendre l'aspect de petites morules dont le contenu ne tarde pas à se transformer en une masse résiduelle brun-jaune. Vers la fin du processus, on trouve çà et là des phagocytes géants à un seul noyau bourrés de vacuoles contenant des débris d'amibocytes ; ils jouent là un rôle analogue à celui des macrophages qui, chez les mammifères, vers la fin d'une réaction inflammatoire aiguë, achèvent le nettoyage du foyer infectieux.

Si la quantité de globules injectés n'a pas été trop forte, le processus de résorption est terminé au bout d'une quinzaine d'heures. Beaucoup d'urnes se sont débarassées de leurs charges et gardent encore souvent à leur pôle glandulaire un bouquet de quatre à cinq amibocytes bourrés d'inclusions brunes.

A partir de ce moment et pendant deux jours environ, on voit flotter dans le liquide cavitaire des ballots d'amibocytes chargés des résidus de la digestion. Jusqu'ici, les vésicules énigmatiques semblent ne prendre aucune part au processus général. Cependant, vers le troisième jour, on note l'apparition dans le

sang d'un grand nombre de vésicules jeunes à un ou deux noyaux. En même temps, le nombre de formations cristalloïdes augmente dans des proportions considérables à l'intérieur des vésicules adultes : ce sont là, chez ces éléments, les signes d'une activité fonctionnelle nouvelle qui ne s'était point manifestée jusque-là.

Vers le troisième jour, en effet, un changement général s'opère dans l'état et l'activité des cellules sanguines. Le nombre des urnes a baissé énormément ; il faut, chez certains individus, chercher pendant un temps assez long pour en trouver deux ou trois dans une goutte de liquide frais ; les ballots d'amibocytes, qui ont pris une couleur brun-rouge, ont tendance à quitter le liquide cœlomique, où ils flottaient librement, pour se précipiter sur les parois de la cavité générale. Ils se déposent entre les faisceaux de muscles longitudinaux qui font saillie sur la paroi interne du cœlome ; on les y aperçoit par transparence à travers le tégument sous forme de petits grains rougeâtres disposés en files parallèles. Ces amas ont visiblement la tendance à se fusionner entre eux et à constituer des masses de plus en plus volumineuses.

Les grands disques ciliés, rares à l'état normal, sont augmentés en nombre ; cette fréquence des disques ciliés est la conséquence de la dégénérescence des urnes.

Les vésicules énigmatiques, dont la surface était jusqu'ici absolument indemne de cellules sanguines, se comportent maintenant vis-à-vis de ces dernières d'une façon nouvelle. On rencontre, en effet, souvent des vésicules adultes à la surface desquelles adhèrent de nombreux érythrocytes reconnaissables à leurs noyaux et à leurs inclusions pyroninophiles; des amibocytes rampent également sur ces surfaces en s'étalant et s'y aplatissant au point de devenir méconnaissables si leurs granulations ne venaient révéler leurs contours ; ils y émettent dans tous les sens de fins et longs prolongements qui forment, en s'anastomosant avec ceux des amibocytes voisins, des réseaux identiques à ceux que nous avons décrits au précédent chapitre.

Si maintenant nous examinons au microscope les ballots d'amibocytes déposés sur la paroi du cœlome, nous constatons que leur structure actuelle est plus complexe que celle des amas formés au début par simple agglutination des amibocytes. A leur surface sont accolées des urnes nombreuses qui ont fusionné leur charge d'amibocytes avec l'amas principal. Des vésicules énigmatiques sont engagées profondément dans l'épaisseur de ces massifs cellulaires; beaucoup d'entre elles sont plissées, allon-

gées, flasques et certainement en train de vider leur contenu; elles constituent de la sorte aux amas agglutinés une armature solide servant de ciment qui accole ces dernières à d'autres amas semblables. Plusieurs petits ballots primitifs viennent s'agglomérer autour des vésicules énigmatiques et forment des masses de plus en plus volumineuses; nous assistons ainsi à la formation des gros corps bruns de la cavité générale (planche XVIII, fig. 2).

Il se produit de la sorte, vers le troisième jour, une véritable crise qui marque le dernier terme du processus de balayage du liquide cœlomique; les vésicules énigmatiques remplissant très certainement à cette occasion un rôle agglutinant vis-à-vis des petits ballots épars, rôle complémentaire de celui des urnes. On verra dans un autre mémoire que, chez les Phascolosomes, cette fonction des vésicules se manifeste avec plus de précocité et plus d'intensité encore que chez les siponcles. Cinq jours après l'inoculation, le sang se trouve dans un état manifestement pathologique. Non seulement les urnes sont extrêmement réduites en nombre, mais leur fonctionnement lui-même est excessivement ralenti ; malgré le jeu persistant des cils, leur pouvoir agglutinant est devenu très faible, ainsi qu'il est facile de s'en assurer en faisant *in vitro* un mélange de sang du cinquième jour et de globules de mouton : ces derniers flottent dans la zone d'action des cils sans être entraînés ni fixés au pôle glandulaire. Il n'existe presque plus d'amibocytes dans le liquide, ces éléments étant pour la plupart engagés dans la formation des amas phagocytaires. Enfin les hématies présentent un état d'anisocytose des plus prononcés. L'anémie est complète. Nous sommes là en pleine crise de destruction sanguine, conséquence de l'effort considérable accompli par l'organisme pour se débarrasser des particules étrangères.

Le liquide cœlomique recueilli deux semaines après l'inoculation nous montre une réparation commençante des cellules sanguines. Les urnes se sont multipliées et ont presque atteint le taux normal, sans que l'on puisse encore parler d'hyperproduction de ces éléments. Les amibocytes, par contre, ont augmenté dans des proportions très grandes et sont notablement plus nombreux que dans les conditions habituelles ; cette leucocytose réparatrice se fait surtout au profit des amibocytes hyalins, dont la proportion relative est double au moins de ce que l'on trouve à l'état normal. A ce moment, le nombre des gros corps bruns du cœlome est particulièrement élevé.

L'étude *in vitro* du liquide cavitaire récolté à divers intervalles après l'inoculation des globules rouges, montre l'apparition dans le plasma d'un pouvoir hémolytique énergique. Ce pouvoir est nul dans le plasma normal.

Si à 2 centimètres cubes de liquide cœlomique récolté douze heures après l'inoculation on mélange, dans un tube à hémolyse, une goutte d'émulsion à 1/20 de globules rouges de mouton, on constate, après sédimentation des cellules sanguines, que le plasma a pris une teinte rosée qui, au spectroscope, donne la bande d'absorption de l'oxyhémoglobine. Ce phénomène est beaucoup plus accentué avec le sang de vingt-quatre heures : une demi-heure à une heure après la confection du mélange, le plasma est coloré en rose vif. Si à ce moment on examine au microscope l'aspect des globules rouges mélangés au plasma, on voit que la plupart d'entre eux, au lieu de présenter l'aspect contracté et crénelé qui leur est habituel lorsqu'on les introduit dans du plasma normal (concentration saline hypertonique), se gonflent, deviennent sphériques, puis laissent échapper leur hémolysine dans le liquide ambiant. Le pouvoir hémolytique, très marqué avec le plasma de trois jours, atteint son maximum d'énergie dans le liquide cœlomique de cinq à six jours : à ce moment, l'hémolyse est totale en moins d'une demi-heure à la température du laboratoire et le plasma se colore en rouge cerise. Deux semaines après l'inoculation, le pouvoir hémolytique du plasma se manifeste avec la même intensité.

En somme, le maximum d'activité hémolytique semble coïncider avec la phase de destruction maxima des cellules sanguines ; elle n'apparaît qu'après que l'englobement des globules est terminé et reste excessivement faible tant qu'il persiste des globules libres dans le cœlome. Il est probable que ce sont les substances diffusées par suite de la lyse des urnes, peut-être aussi par celle des vésicules énigmatiques, qui confèrent au plasma cette propriété nouvelle. Nous n'avons pu établir pendant combien de temps elle persiste dans le plasma après la guérison.

Notons que les globules rouges sensibilisés, qui sont agglutinés par les urnes plus énergiquement encore que les globules simplement lavés, sont infiniment moins sensibles à l'action hémolysante du plasma : cette action est toujours très faible, parfois nulle. Il y a là une dissociation intéressante à relever entre les actions agglutinante et hémolytique. Ce phénomène paradoxal est comparable à celui que nous avons décrit chez *Maia Squinado,* immunisée contre les globules rouges de mouton : son

sérum, hémolytique pour les globules lavés, ne l'est pas pour les globules sensibilisés ; nous avons montré qu'une substance, existant à l'état normal, mais particulièrement développée chez les individus immunisés et adsorbable par les globules sensibilisés, se fixe sur ces derniers et empêche l'hémolyse par le complément de cobaye. C'est apparemment une substance de même nature qui s'oppose chez le siponcle à l'adsorption de l'hémolysine.

Tel est le tableau du processus normal qui suit une injection unique de globules rouges. Voyons maintenant comment se comporte, vis-à-vis d'une réinoculation, un individu ayant reçu au préalable une ou plusieurs injections d'antigène.

Nos siponcles recevaient à six jours d'intervalle 0,25 centimètres cubes d'une émulsion de globules rouges à 1/20 dans l'eau de mer. Ils étaient sacrifiés six, dix, quinze jours après la deuxième ou la troisième injection. L'étude du sang *in vitro* a été ici particulièrement instructive. Voici d'abord ce que nous enseigne l'observation de l'animal vivant :

Dans le sang de six jours, les urnes témoignent d'une activité exceptionnelle ; toutes traînent des paquets de phagocytes bourrés de globules rouges dont la longueur dépasse notablement le diamètre antéro-postérieur de l'élément cilié ; mais leur nombre est encore inférieur à la normale, conséquence de la destruction intense de ces éléments qui s'est faite au cours des inoculations successives. Aussi, malgré l'énergie de leur action agglutinante, n'ont-elles pas encore débarrassé le liquide de tous les globules rouges injectés, et l'on trouve encore çà et là des globules libres ; ces derniers sont rétractés, crénelés, sans aucune tendance à l'hémolyse.

Les vésicules énigmatiques sont en nombre énorme et de toutes tailles : il y a hyperproduction de ces éléments.

Le nombre des amibocytes est, lui aussi, exceptionnellement grand ; l'hyperleucocytose est intense. Ils sont généralement bourrés de globules rouges à tous les stades de la digestion intracellulaire. Les macrophages abondent ; leur cytoplasma est encombré d'inclusions provenant de la digestion des petits phagocytes.

Bref, le sang, éprouvé par l'effort fourni, n'a pas encore complètement réparé ses pertes, bien qu'il y ait surproduction de certaines catégories de cellules sanguines. L'activité fonctionnelle de ces éléments est très considérable ; de plus, lorsque l'on introduit le sang dans un tube, l'on constate que les masses

agglutinées par les urnes vont se précipiter sur les parois du verre, auxquelles elles adhèrent très fortement, et cela en l'espace de quelques secondes ; c'est là, très probablement, un phénomène d'ordre électrostatique tout à fait caractéristique et qui ne se produit pas avec le sang d'un témoin normal inoculé pour la première fois.

Très différent est l'aspect que présente le sang de dix jours. Il fourmille littéralement d'urnes ; leur nombre est infiniment plus grand qu'à l'état normal. Elles se meuvent avec une surprenante rapidité, et l'énergie avec laquelle les cils accomplissent leurs mouvements vibratoires est un spectacle saisissant ; la plupart se sont débarrassées de leurs charges. D'énormes ballots d'amibocytes bourrées d'inclusions brunes flottent dans le liquide cavitaire. Il n'y a plus de globules rouges libres. Le nombre des hématies en voie de division directe est très grand et les formes à deux ou à quatre noyaux abondent.

Ce tableau est sensiblement le même que celui que l'on trouve chez le siponcle de quinze jours ; lorsque l'on saigne l'animal, il s'en échappe une véritable grêle de corps bruns variant de la taille d'un grain de mil à celle d'un petit pois, et de teintes parcourant toute la gamme des ocres jaunes et bruns.

On voit, en résumé, d'après ce que nous enseigne l'observation microscopique, que l'état d'immunité acquise vis-à-vis des globules rouges se traduit chez le siponcle par une hyperproduction de toutes les cellules qui concourent à la défense de l'organisme, ainsi que par une intensification de leur activité fonctionnelle. L'étude *in vitro* va nous permettre de préciser encore davantage les différences qui existent, au point de vue des réactions de défense, entre le liquide cavitaire d'un siponcle qui subit pour la première fois l'imprégnation par les globules rouges étrangers et celui d'un individu qui a reçu antérieurement des inoculations répétées d'antigène.

Dans ce but, nous préparons avant chaque expérience :

a) Une émulsion à 1/20 dans l'eau de mer de globules de mouton lavés ;

b) La même émulsion dans l'eau de mer diluée et ramenée à l'isotonie pour les globules rouges ;

c) et *d)* Les mêmes émulsions sensibilisées par du sérum anti-mouton.

Chacune de ces émulsions est mélangée à la dose de 0,2 centimètre cube avec 3 centimètres cubes de l'un des liquides suivants :

a) Sang total de siponcle immunisé ;

b) Portion clarifiée (plasma) de ce sang après sédimentation des éléments lourds : ce plasma ne tient en suspension que les urnes ;

c) et *d)* Mêmes mélanges avec sang de siponcle témoin normal n'ayant subi aucune inoculation antérieure.

1° *Siponcle de six jours.* — Il a reçu deux injections de globules rouges de mouton à six jours d'intervalle. On le saigne six jours après la deuxième injection. (Pour l'aspect microscopique du liquide cœlomique, voir plus haut.)

Une heure après la confection des mélanges, alors que la sédimentation s'est effectuée et que tous les tubes présentent une colonne supérieure de liquide clair, une différence nette apparaît entre les tubes contenant du sang de siponcle à trois injections et ceux contenant le sang du témoin. Sur les parois du premier se sont collés, de façon très adhérente, de gros grumeaux rouges, bien délimités ; dans le liquide, le nombre des urnes nageant est minime. Rien de tel chez le témoin : aucun dépôt sur les parois diverses, pas trace. Au contraire, le liquide clair fourmille d'urnes, rendues d'autant plus visibles à la loupe qu'elles traînent de longs paquets de globules rouges agglutinés. A l'examen microscopique, les masses adhérentes au verre, chez l'immunisé, se composent d'urnes, de globules rouges, de vésicules énigmatiques et de phagocytes. Notons ici que, sitôt le liquide cavitaire de l'immunisé introduit dans le tube *et avant toute addition de globules rouges,* leurs urnes, avec leurs traînées d'amibocytes agglutinés, quittent le liquide ambiant et viennent se précipiter sur les parois du verre, en fusionnant leurs charges et en y formant des grumeaux solidement amarrés. Cette sensibilité aux moindres modifications survenues dans l'état d'équilibre physico-chimique des humeurs est absolument caractéristique des individus en voie d'immunisation ; elle se traduit chez eux par un état d'instabilité qui détermine une agglutination instantanée, en masses complexes, des cellules défensives et leur accolement aux surfaces voisines. C'est sur ces masses préformées que les globules rouges, porteurs d'une charge électrique de signe contraire à celle des amas précipités, viennent se précipiter à leur tour sitôt qu'elles sont introduites dans le liquide. Notons qu'à la confection de ces complexes cellulaires ne participent à aucun degré ni les hématies propres de l'animal, ni les cellules sexuelles.

D'autre part, et dès le début du processus, la phagocytose *in vitro* s'opère chez l'immunisé avec une étonnante rapidité ; dans

les tubes contenant des globules sensibilisés, elle est presque instantanée. Moins d'une heure après la confection du mélange, la plupart des amibocytes sont transformés en morules bourrées de golbules rouges ; rien de tel chez le témoin, où la réaction phagocytaire se borne, au même moment, à la présence rare de globules rouges à l'intérieur de quelques amibocytes. Au bout de cinq heures de mélange, les différences se sont accentuées encore. Chez l'immunisé, il n'y a plus d'urnes nageant dans le liquide ; toutes se sont précipitées et cette précipitation s'accompagne d'une agglutination intense et totale des globules rouges.

Il n'existe plus à ce moment de globules rouges libres : les complexes cellulaires dont il vient d'être question adhèrent solidement à la paroi, dont il est parfois malaisé de les détacher ; ou bien ils tombent au fond et forment à la surface du sédiment une couche floconneuse d'un blanc de neige, composée de cadavres d'urnes associés aux éléments qui entrent dans la constitution des dépôts de la paroi. Ce dépôt floconneux s'organise rapidement et donne naissance à une pellicule élastique, résistante, de consistance presque cartilagineuse, due surtout à la présence des vésicules énigmatiques ; cette pellicule peut s'enlever d'un seul coup avec la pointe d'une aiguille ; examinée entre lame et lamelle, sans coloration, à un faible grossissement, elle donne l'aspect figuré à la planche XVI : des îlots rougeâtres, parfaitement délimités, de taille variable, et dépassant souvent 300-400 de diamètre, plus ou moins arrondis et entourés chacun d'une zone claire qui lui constitue une sorte de capsule. A un grossissement plus fort, l'on voit ceci : les amas rougeâtres sont constitués par des globules rouges fortement agglutinés, tassés à la surface des disques ciliés et comme enserrés dans les limites du bourrelet glandulaire dont ils ont, de la sorte, épousé la forme : d'où leur contour discoïdal ; ces amas, avec leur support, sont rapidement entourés par les phagocytes (hyalins et granuleux) qui, en fusionnant leurs cytoplasmas, forment de vastes plasmodia englobant à la fois le disque et l'amas agglutiné (planche XVII, fig. 1 et 2 ; planche XVIII, fig. 1). Le processus est identique, qu'il s'agisse des complexes cellulaires déposés sur la paroi ou de ceux qui adhèrent à la surface du sédiment.

Ces disques ciliés qui, avec leurs charges de globules agglutinés, forment le centre des cellules géantes, proviennent, on le sait, d'urnes découronnées dont le corps globuleux subit la lyse et laisse diffuser son contenu dans le liquide ambiant.

Dans le sédiment, on assiste à une multiplication active des

vésicules énigmatiques ; les formes jeunes à un ou deux noyaux sont plus nombreuses encore que dans le sang récolté. C'est la continuation *in vitro* du processus de multiplication constaté chez l'animal vivant.

Dans les tubes témoins, toutes ces réactions à caractère exubérant sont réduites à l'état d'ébauche. L'agglutination des globules rouges par les urnes a lieu, mais incomplètement, et un grand nombre de globules flottent encore librement à un moment

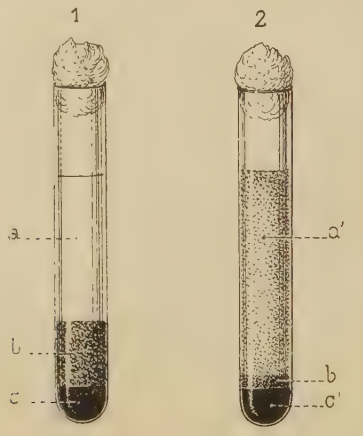


Fig. 3. — *Siponcle ayant reçu deux injections de globules rouges de mouton* saigné six jours après la dernière ; mélange « in vitro » de globules rouges et de sang.

1, Tube contenant des globules rouges et du sang de siponcle immunisé.

2, Témoin avec globules rouges et sang normal.

Au bout de quelque temps, clarification totale dans *1* ; pas de clarification dans *2*, les urnes continuent à y fourmiller.

a, Liquide clarifié ; *a'*, liquide fourmillant d'urnes.

b et *b'*, Dépôts d'urnes et de vésicules : on voit que le dépôt est énorme chez l'immunisé, très faible chez le témoin.

c et *c'*, Sédiment d'éléments lourds, égal dans les deux tubes.

où, dans les tubes contenant du sang d'immunisé, cette agglutination est achevée depuis plusieurs heures ; les phagocytes ne pénètrent que lentement dans les amas agglutinés ; il n'y a pas de précipitation de complexes cellulaires, pas de formation de plasmodia phagocytaires, pas de lyse des urnes, pas de multiplication des vésicules énigmatiques.

Au contraire, chez l'immunisé, il y a tout à la fois surproduction de cellules, intensification des pouvoirs agglutinant, phagocytaire et sécréteur, accroissement de la viscosité des surfaces,

diffusion dans le plasma de substances visqueuses émanées des urnes et peut-être des vésicules énigmatiques ; enfin très probablement accroissement des charges électriques sur les urnes et les complexes formés autour d'elles.

Notons, chez le siponcle immunisé, l'absence totale de pouvoir hémolytique dans le sang, pouvoir qui, chez le siponcle normal à une seule injection, apparaît presque aussitôt après que les globules ont disparu du liquide cœlomique.

2° *Siponcle de dix jours.* — Il a reçu deux injections de globules rouges de mouton à six jours d'intervalle et a été saigné dix jours après la deuxième injection.

Les deux phénomènes qui frappent au premier abord, c'est l'énergie du pouvoir hémolytique et l'accroissement énorme du nombre des urnes. Après addition de globules rouges *in vitro*, l'hémolyse est totale en moins d'une heure, alors qu'elle est nulle chez le témoin ; dans les paquets agglutinés, les globules rouges ont perdu leurs contours et se présentent sous formes d'amas amorphes diffusément colorés en rouge-brun par l'hémoglobine. Comme on le voit, chez le vacciné, de même que chez le siponcle normal, ce pouvoir n'apparaît qu'après que les globules rouges ont été complètement résorbés par les phagocytes.

Les urnes fourmillent en nombre immense ; non seulement elles sont infiniment plus nombreuses que dans le sang de six jours, mais elles présentent des phénomènes de lyse particulièrement énergiques ; dans le dépôt floconneux formé à la surface du sédiment, elles s'accumulent en amas épais, perdant leurs bourrelets ciliés, émettant en grande abondance les grosses boules réfringentes et les traînées visqueuses signalées ailleurs. Il semble bien que le développement du pouvoir hémolytique dans le plasma soit en relation directe avec la lyse des urnes et avec son intensité.

Notons, pour terminer, qu'ici également les globules rouges sensibilisés par le sérum antimouton sont moins complètement hémolysés par le plasma de siponcle immunisé que les globules simplement lavés.

Résumé.

De cet ensemble de faits se dégage un certain nombre de notions que nous résumons ici :

L'introduction dans le cœlome de *Sipunculus Nudus* de globules rouges de mouton provoque de la part des cellules de

l'organisme un certain nombre de réactions qui ont pour résultat final l'élimination des particules étrangères en suspension dans le liquide cavitaire, leur résorption et l'incorporation définitive des résidus de ce processus aux corps bruns de la cavité générale. Cette résorption est l'œuvre exclusive des phagocytes ; les amibocytes hyalins et ceux à fines granulations éosinophiles y participent ; les globules rouges englobés sont digérés et transformés en inclusions intracellulaires brunes, colorables par le rouge neutre. Le plasma ne possède par lui-même aucun pouvoir hémolytique ou cytolytique.

L'acte phagocytaire est préparé et singulièrement facilité par l'action agglutinante des urnes ; celles-ci débarrassent rapidement le liquide cavitaire des globules, qu'elles fixent à leur pôle postérieur en les englùant au moyen de leurs sécrétions visqueuses. C'est là le premier acte qui suit la pénétration des particules étrangères dans le cœlome. La masse agglutinée, bientôt envahie par les phagocytes, se trouve de la sorte incluse dans un vaste plasmodium amibocytaire, au sein duquel s'effectue la digestion intracellulaire. Bon nombre de globules rouges sont d'ailleurs phagocytés directement en dehors de toute agglutination préalable par les amibocytes libres. Les masses agglutinées ne tardent pas à s'agglomérer entre elles et à former des amas de plus en plus volumineux qui, après avoir flotté quelque temps dans le liquide, finissent par se déposer sur les parois du cœlome. Les vésicules énigmatiques, inactives en apparence au début de la réaction sanguine, se recouvrent vers le troisième jour d'une sécrétion visqueuse à laquelle viennent adhérer nombre d'amibocytes chargés de résidus digestifs ; elles prennent une part importante, mais qu'il est encore difficile de définir exactement, à la genèse des gros ballots cellulaires et servent à cimenter entre eux les petits amas agglutinés, accomplissant ainsi une fonction complémentaire de celle des urnes. Ainsi se constituent des corps bruns, composés d'amas de leucocytes agglutinés, d'urnes plus ou moins dégénérées et de vésicules énigmatiques en déliquescence ; des amibocytes s'étalent à leur surface et les revêtent à la façon d'un endothélium, d'un syncytium plus ou moins continu.

Cet effort de l'organisme a pour conséquence une cytopénie prononcée du liquide cavitaire ; vers la fin du processus réactionnel, urnes, vésicules énigmatiques, amibocytes, sont excessivement réduits numériquement. Les hématies, elles aussi, ont diminué de nombre et le liquide cœlomique présente à ce moment

un état pathologique qui met l'organisme en état de moindre résistance et peut être comparé à la phase négative décrite chez les vertébrés supérieurs au cours des immunisations.

La réparation cellulaire ne tarde pas à se faire ; des amibocytes hyalins envahissent bientôt le liquide cavitaire, en même temps que des formes jeunes de vésicules énigmatiques y apparaissent en grand nombre. L'on constate à ce moment une active multiplication des hématies. La régénération des urnes se produit un peu plus lentement ; elle n'est pas encore achevée au bout de deux semaines. Cette réfection des cellules sanguines va bien au delà du chiffre normal, et la réaction de défense s'achève par une surproduction de toutes les cellules qui, à des degrés divers, concourent à la défense de l'organisme. Une première imprégnation par les globules rouges laisse de la sorte le liquide cavitaire plus fortement armé en éléments défensifs.

Au cours de ce processus, beaucoup d'urnes ont été mises hors d'usage et se sont désagrégées, abandonnant souvent, comme témoin de cette fonte, les grands disques ciliés dont il a été question plus haut. Le pouvoir hémolytique très net qui apparaît dans le plasma après la résorption des globules rouges semble lié à la lyse des urnes et est dû, vraisemblablement, aux substances que celles-ci ont laissé diffuser au dehors.

Cette lyse des urnes traduit l'effort accompli par la cellule ciliée au cours de la réaction inflammatoire. Elle est provoquée par la présence de l'antigène-globules rouges. A mesure que se développe l'immunisation, la cellule semble d'abord se « sensibiliser » à l'action de l'antigène et subir une fonte d'autant plus précoce et d'autant plus complète que les réactions de défense gagnent en intensité.

Le processus d'immunisation est caractérisé par une surproduction de tous les éléments cellulaires qui, par suite du conflit entre l'organisme et les particules étrangères, ont subi une destruction partielle ; urnes, amibocytes, vésicules, sont infiniment plus nombreuses chez l'individu ayant été soumis à deux ou trois inoculations successives que chez l'individu normal. Cette intensification n'est pas seulement numérique, elle est aussi fonctionnelle : vis-à-vis d'un nouvel apport d'antigène, les cellules réagissent avec plus d'énergie que les cellules normales : le pouvoir agglutinant des urnes est plus fort ; leur sécrétion se fait avec plus d'abondance ; cette sécrétion a acquis la propriété de provoquer l'hémolyse des globules rouges englués dans sa masse ; la phagocytose, la digestion intracellulaire s'effec-

tuent avec une précocité et une énergie incomparablement plus grandes ; les vésicules énigmatiques s'accolent aux paquets agglutinés dès le début de la réaction sanguine. Bref, il existe une suractivation de toute la vie cellulaire.

Mais ce qui caractérise d'une façon plus frappante encore, chez nos animaux, l'immunité en voie de réalisation, c'est la tendance que présentent les cellules défensives (et rien qu'elles) à se précipiter les unes sur les autres, à s'agglomérer en caillots qui eux-mêmes se précipitent sur les surfaces voisines et y adhèrent fortement. Ce phénomène différencie nettement, et à première vue, l'individu normal de celui qui a surmonté victorieusement des imprégnations successives par l'antigène. Sitôt l'équilibre physico-chimique des humeurs rompu, soit par une inoculation nouvelle de particules étrangères à l'animal vivant, soit par la simple introduction du liquide cavitaire dans un tube de verre, des agglomérations d'amibocytes, de vésicules énigmatiques, d'urnes avec leurs charges de globules, se forment avec l'instantanéité d'un phénomène de coagulation. A la surface de ces amas, les urnes subissent la fonte avec une étonnante rapidité ; il en est de même des vésicules : mais ici le phénomène est plus discret ; les disques ciliés, avec leurs charges de globules rouges devenus libres par la lyse du corps de l'urne, sont envahis par les phagocytes qui s'organisent autour d'eux en cellules géantes ; celles-ci, à leur tour, deviennent partie intégrante des agglomérations cellulaires. Au sein de ces masses précipitées, la phagocytose et la digestion intracellulaire se poursuivent activement. Le produit de la lyse cellulaire pénètre et enveloppe les amas d'une atmosphère visqueuse dans laquelle bon nombre d'hématies propres du siponcle viennent se prendre à leur tour. En même temps, un pouvoir hémolytique très accusé apparaît dans le sang. Notons qu'à chaque injection nouvelle d'antigène à l'animal ce pouvoir disparaît pour reparaître avec plus d'intensité sitôt que la résorption globulaire s'est effectuée.

En somme, augmentation numérique des cellules défensives, intensification de leur activité fonctionnelle ; tendance des cellules à l'agglutination et à la précipitation ; sensibilisation des urnes se traduisant par la lyse en masse de ces éléments à un court intervalle après l'addition d'antigène ; développement de propriétés hémolysantes dans la sécrétion de l'urne et apparition d'un fort pouvoir hémolytique dans le plasma : tels sont les traits principaux qui caractérisent la phase d'immunisation chez le siponcle inoculé avec des globules rouges de mouton.

Je dis à dessein phase d'immunisation et non état d'immunité, n'ayant pas eu l'occasion d'observer les réactions du liquide cavitaire à un intervalle suffisamment éloigné de la dernière inoculation.

J'insiste encore, en terminant, sur la formation des conglomérats cellulaires chez les siponcles en voie d'immunisation. Malgré l'absence de coagulation dans le plasma même, malgré l'absence de formation de fibrine, il est difficile de ne pas voir, dans la formation quasi instantanée de grumeaux de cellules si solidement liées les unes aux autres, une manifestation de la vie cellulaire qui rentre dans la catégorie des phénomènes de coagulation ; et comment ne pas soupçonner, dès lors, l'importance générale que doivent présenter les phénomènes de coagulation dans la série des réactions propres aux êtres immunisés ?

(A suivre.)

PLANCHE I

Modification des hématies vers la fin des infections et au cours du processus de réparation qui suit ces dernières.

Fig. 1. — Microcytes.
Fig. 2. — Hématies normales.
Fig. 3. — Macrocytes avec granules pyroninophiles multiples.
Fig. 4 et 5. — Hématies en division directe dans le liquide cavitaire, montrant la multiplication du grain pyroninophile qui accompagne la division nucléaire et la présence du « corps jaune ».
Fig. 6 et 7. — Hématies en voie de division au stade (4) avec quatre grains pyroninophiles et début de division du cytoplasme. Le « corps jaune » a disparu.

PLANCHE II

Fig. 1 à 10. — **Diverses catégories d'amibocytes.**
Fig. 1. — Amibocytes hyalins jeunes (lymphocytes).
Fig. 2. — Amibocytes hyalins.
Fig. 3. — Gros amibocyte hyalin bourré de résidus digestifs.
Fig. 4. — Amibocyte hyalin contenant quelques granulations éosinophiles.
Fig. 5. — Amibocytes granuleux à granulations éosinophiles.
Fig. 6. — Amibocyte éosinophile ayant phagocyté des globules rouges de mouton.
Fig. 7 et 8. — Amibocytes mûriformes à sphérules amphophiles avec tendance acidophile (éléments jeunes).
Fig. 9. — Amibocyte hyalin en train de se charger de sphérules amphophiles.
Fig. 10. — Amibocytes mûriformes à sphérules amphophiles avec tendance basophile (éléments âgés).

Fig. 11 à 15. — **Transformation des inclusions pyroninophiles en corps bruns intracellulaires.** (Siponcle inoculé avec la bactérie du siponcle.)
Fig. 11. — Phagocyte bourré de bactéries. Coloration à la pyronine-vert de méthyle.
Fig. 12. — Une partie des bacilles digérés ont donné naissance à des masses amorphes pyroninophiles.
Fig. 13. — Résidus pyroninophiles de la digestion intracellulaire des bactéries.
Fig. 14. — Transformation des résidus en corps bruns qui perdent l'affinité pour la pyronine.
Fig. 15. — Transformation définitive en corps bruns des résidus de la digestion des bactéries.

PLANCHE III

Fig. 1 à 7. — **Phagocytose du *B. tumefaciens*.**
Fig. 1 à 3. — Phagocytes hyalins bourrés de bacilles. Vacuoles digestives.
Fig. 4. — Amibocytes éosinophiles avec bacilles phagocytés dans une vacuole digestive.
Fig. 5 et 6. — Transformation en corps bruns des bacilles phagocytés. En (6), les bactéries ayant subi la transformation brune sont encore reconnaissables à leur forme.
Fig. 7. — Macrophage et restes d'amibocytes englobés.

Fig. 8 à 15. — **Phagocytose de globules rouges de mouton.** Divers stades de digestion intracellulaire jusqu'à l'hématolyse totale (fig. 9) ou la transformation définitive en corps bruns (fig. 14 et 15).

PLANCHE IV

Réseau d'amibocytes formé à la surface d'une lame de verre immergée dans un mélange *in vitro* de sang de siponcle normal et de *B. tumefaciens*. Examen pratiqué quinze minutes après l'immersion des lames.

Les bactéries se sont accolées en masse à la surface des amibocytes et le long des traînées visqueuses émanées de ces éléments.

PLANCHE V

Fig. 1. — Réseau d'amibocytes formé à la surface d'une lame de verre immergée dans le sang de siponcle normal ; les cellules s'anastomosent par l'intermédiaire de traînées hyalo-plasmiques émanées de leur corps.

Fig. 2. — Agglutination des amibocytes. Ballot d'amibocytes agglutinés à la suite de l'injection de *B. tumefaciens* dans la cavité péritonéale d'un siponcle normal. Au centre du conglomérat, les amibocytes sont fusionnés en plasmodium parsemé de vacuoles. A la périphérie, ils ont conservé leur individualité cellulaire.

PLANCHE VI

Fig. 1 et 2. — Plasmodia amibocytaires formés à la surface de lames de verre immergées dans un mélange de *B. tumefaciens* et de sang de siponcle immunisé contre ce bacille. Les cellules géantes sont constituées moins de quinze minutes après l'immersion.

PLANCHE VII

Fig. 1. — Refoulement des hématies du siponcle par l'urne en progression. Au niveau du plan dans lequel est situé le faisceau antérieur des cils, les hématies sont rejetées et maintenues à distance. Un bouquet d'amibocytes est fixé au pôle postérieur.

Fig. 2. — Urnes traitées *intra vitam* par le rouge neutre et fixees aux vapeurs osmiques. On y voit les grains rouges entourant le noyau, les bâtonnets érythrophiles situés à la base des cils et quelques amibocytes collés au pôle glandulaire (qui ont fait croire à certains auteurs à la présence de noyaux multiples).

PLANCHE VIII

Fig. 1. — Urne traînant une charge de globules rouges de mouton engluée dans la substance muqueuse sécrétée par le pôle glandulaire. Les hématies propres du siponcle sont maintenues à distance.

Fig. 2. — Trois urnes ayant fusionné leurs charges de globules de mouton.

PLANCHE IX

Fig. 1 et 2. — Deux urnes de siponcle immunisées contre *B. tumefaciens*, quinze minutes après le mélange *in vitro* de bactéries et de sang de l'animal. L'agglutination des bactéries a été pour ainsi dire instantanée.

En (1), les amibocytes se sont agglomérés en paquets à l'extrémité du panache bactérien et commencent à y pénétrer. En (2), l'on assiste à l'arrivée des premiers amibocytes (préparation faite d'après la méthode des lames immergées dans le mélange).

PLANCHE X

Fig. 1. — Pénétration des amibocytes dans un paquet bactérien (bacilles du siponcle agglutinés par l'urne). Coloration *intra vitam* par le rouge neutre ; les inclusions rouges des amibocytes permettent de suivre leur marche. Les cellules parvenues au pôle de l'urne ont déjà transformé en corps bruns les masses phagocytées.

Fig. 2. — Action agglutinante d'une urne chez un siponcle cocaïné (méthode des lames immergées). L'immersion s'est faite dans un mélange de sang de siponcle cocaïné et de *B. tumefaciens* ; la lame a été retirée deux heures après l'immersion dans le mélange. Enorme panache en éventail de sécrétion visqueuse ayant agglutiné des masses de bactéries. Des amibocytes ont adhéré à la masse, restant accolés à la surface, gardant la forme sphérique, à l'état de dispersion et ne phagocytant pas (figure demi-schématique).

PLANCHE XI

Lyse des urnes chez un siponcle immunisé contre le *B. tumefaciens*. Urne en voie de lyse amarrée à une vésicule énigmatique à laquelle commencent également à adhérer des amibocytes bourrés de bactéries. Début de formation d'un complexe cellulaire.

PLANCHE XII

Désintégration des urnes.

Fig. 1. — Disques ciliés provenant du découronnement d'une urne portant son noyau à la périphérie et recouverte d'une mosaïque d'hématies de siponcle ayant adhéré à sa surface et ayant pris la forme polygonale par compression réciproque. Entre les hématies rampent des amibocytes.

Fig. 2. — Disque cilié sans mosaïque d'hématies, avec amibocytes rampant à sa surface.

Fig. 3. — Urne en train de se vider de son contenu sous forme de grosses boules réfringentes faisant hernie au dehors.

Fig. 4. — « Haillon d'urne » découronnée et en partie vidée de son contenu.

PLANCHE XIII

Au sang d'un siponcle immunisé contre *B. tumefaciens*, on a ajouté *in vitro* une émulsion de bacilles. Fragment de voile flottant dans le plasma. Ce voile résulte de la lyse des urnes ; les disques ciliés seuls restent intacts avec leurs charges de leucocytes bourrées de bactéries. A la surface du voile sont accolés de nombreux phagocytes bourrés de bactéries.

PLANCHE XIV

Formation des complexes cellulaires chez un siponcle immunisé contre le *B. tumefaciens*. Fixation des urnes sur le rebord des vésicules énigmatiques.

Fig. 1. — Urne s'accolant à la vésicule par son corps en voie de lyse.

Fig. 2. — Deux urnes s'accolant à une vésicule par l'intermédiaire de leurs charges d'amibocytes bourrées de bactéries.

PLANCHE XV

Injection de globules rouges de mouton à un siponcle normal. Urnes avec leurs charges de globules dans lesquels ont pénétré des phagocytes.

Fig. 1. — Au pôle de l'urne, phagocytes bourrés de globules rouges qui sont en train d'être convertis en inclusions brunes.

Fig. 2. — Sang traité *intra vitam* par le rouge neutre. Le contenu des phagocytes (globules rouges) se colore vivement par le rouge ; les globules agglutinés non encore phagocytés restent incolores.

PLANCHE XVI

Siponcle à plusieurs injections de globules rouges de mouton. Nodules inflammatoires formés *in vitro* autour des amas de globules agglutinés et constituant une véritable « peau » à la surface du sédiment. Autour des amas agglutinés enfermés dans les cellules géantes, les amibocytes forment des capsules composées de couches concentrées de cellules amiboïdes jouant le rôle de fibroblastes.

Préparation dessinée à un faible grossissement. (Voir le détail pl. XVIII, fig. 1.)

PLANCHE XVII

Siponcle à injections répétées de globules rouges de mouton. A la surface du sédiment *in vitro*, les amas de globules agglutinés par le disque cilié de l'urne sont entourés de plamodia amibocytaires à l'intérieur desquels ils subissent la digestion intracellulaire.

Fig. 1. — Amas de globules agglutinés encore adhérents à l'urne et enfermés dans un vaste plasmodium d'amibocytes.

Fig. 2. — Plasmodium d'amibocytes formé autour d'ur disque cilié porteur de globules rouges de mouton.

PLANCHE XVIII

Fig. 1. — Siponcle ayant reçu plusieurs inoculations de globules rouges de mouton. Cellules géantes nées par confluence des amibocytes autour d'un disque cilié d'urne chargé de globules (détail d'un point de la planche XVI).

Fig. 2. — Siponcle ayant reçu plusieurs inoculations de globules rouges de mouton. Formation d'un complexe amibocytes-urnes-vésicules. Amas d'amibocytes bourrés de globules rouges ayant subi la digestion intracellulaire et transformés en inclusions brunes. Trois vésicules énigmatiques sont incorporées à l'amas ; à leur surface rampent des amibocytes. Deux urnes avec leurs charges ont adhéré au complexe.

PLANCHE XIX

Evolution des vésicules énigmatiques observée *in vitro* dans le sang d'un siponcle immunisé contre le *B. tumefaciens* et après addition d'une émulsion bactérienne au liquide sanguin.

Fig. 1. — Vésicule adulte complètement divisée ; les cellules de revêtement sont bien individualisées, séparées par des interstices au fond desquels se trouve la membrane basale. Les cellules qui s'en détachent donnent des vésicules jeunes à un noyau.

Fig. 2. — Vésicules jeunes à un noyau, les plus jeunes ne dépassant pas beaucoup la taille d'une hématie.

Fig. 3. — Formes de divisions au stade (2).

Fig. 4. — Formes à trois cellules, dont l'une ne s'est pas encore divisée.

Fig. 5. — Formes évoluées à plusieurs noyaux.

Fig. 6. — Vésicule adulte avec nombreuses formations cristalloïdes.

PLANCHE XX

Siponcles immunisés contre *B. tumefaciens*.

Fig. 1. — Conglomérat de vésicules énigmatiques agglutinées entre elles : ce croquis d'une coupe pratiquée dans le conglomérat montre l'exacte coaptation des surfaces agglutinées les unes aux autres.

Fig. 2. — Coupe d'une vésicule énigmatique adulte montrant l'aspect des cellules mûres, prêtes à se détacher pour donner des vésicules énigmatiques jeunes. En certains points, les interstices cellulaires sont bien visibles et montrent le contenu de la vésicule séparé de l'extérieur par la mince membrane basale.

PLANCHE XXI

Cristalloïdes des vésicules énigmatiques, types divers. Formes élémentaires très variables de dimensions en *a* ; se groupant et se juxtaposant pour donner des formes fasciculées comme en *b*, en *c* et en *e*. En *d*, formes ondulées ou digitées par compression. En *f* et en *g*, des cristaux très petits s'implantent sur des faisceaux cristallins volumineux.

PLANCHE XXII

Siponcle immunisé contre *B. tumefaciens*. Conglomérats de vésicules énigmatiques agglutinées qui vont servir d'armature au complexe en formation ; des amas d'amibocytes généralement bourrés de bactéries viennent y adhérer. Cet accolement des amibocytes débute en général dans les angles rentrants formés par la juxtaposition de deux vésicules. En un point de la périphérie de l'amas, on voit une urne y ayant adhéré par l'intermédiaire de sa charge de phagocytes.

PLANCHE XXIII

Fig. 1. — Siponcle immunisé contre le *B. tumefaciens*. Masse de bactéries agglutinées au contact de deux vésicules énigmatiques en train de subir la lyse. (Réaction observée *in vitro*.)

Fig. 2. — Siponcle immunisé contre le vibrion du siponcle (trois inoculations). Saignée. Après clarification de la colonne supérieure, on ajoute un peu d'émulsion bactérienne. Agglutination en masse des bactéries et chute des amas au fond du tube. Dans les amas agglutinés, lyse rapide des vibrions.

a, Forme vibrionienne normale ; *b* et *b'*, transformation granulaire au sein des paquets agglutinés ; *c* et *d*, formes de souffrance gonflées, quelques-unes lysées à l'état de sacs vides qui flottent dans le liquide sans avoir été précipitées.

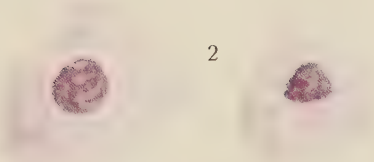
PLANCHE XXIV

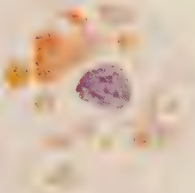
Fig. 1. — Siponcle immunisé contre la bactérie du siponcle (trois injections successives). Saigné neuf jours après la dernière injection. Sang mélangé *in vitro* avec une émulsion de bactéries. Bactéries agglutinées par l'urne. Examen pratiqué une demi-heure après la confection du mélange. La sécrétion est colorée en bleu ; la plupart des bactéries sont transformées en granules en dehors des cellules, ce qui ne se voit jamais chez le siponcle normal. (Coloration au bleu Borrel.)

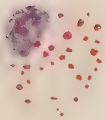
Fig. 2. — Siponcle immunisé contre la bactérie du siponcle (trois injections successives). Sacrifié quatre heures après une quatrième inoculation. Urne avec sa charge de phagocytes bourrée de bactéries, la plupart transformées en granules dans l'intérieur des amibocytes. (Coloration au vert de méthyle-pyronine.)

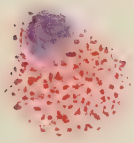
1
2
3
4
5
6
7

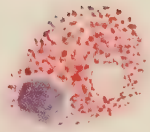
1

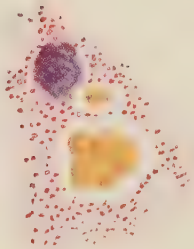

2

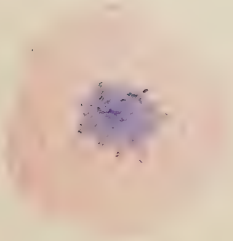

3

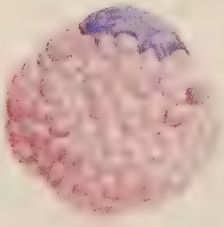

4

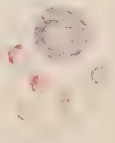

5

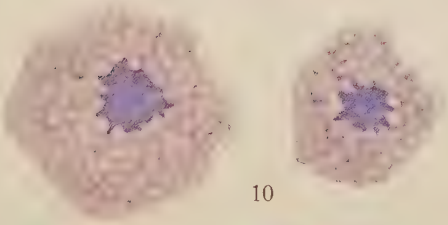


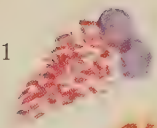

6

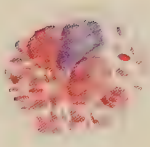

7

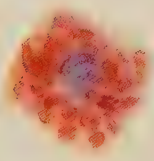

8

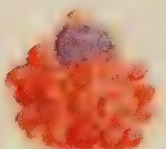

9

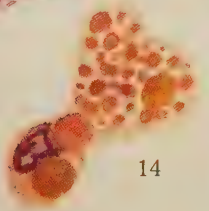

10

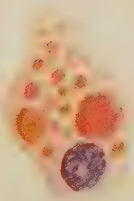

11

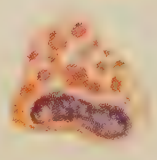

12

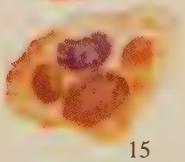


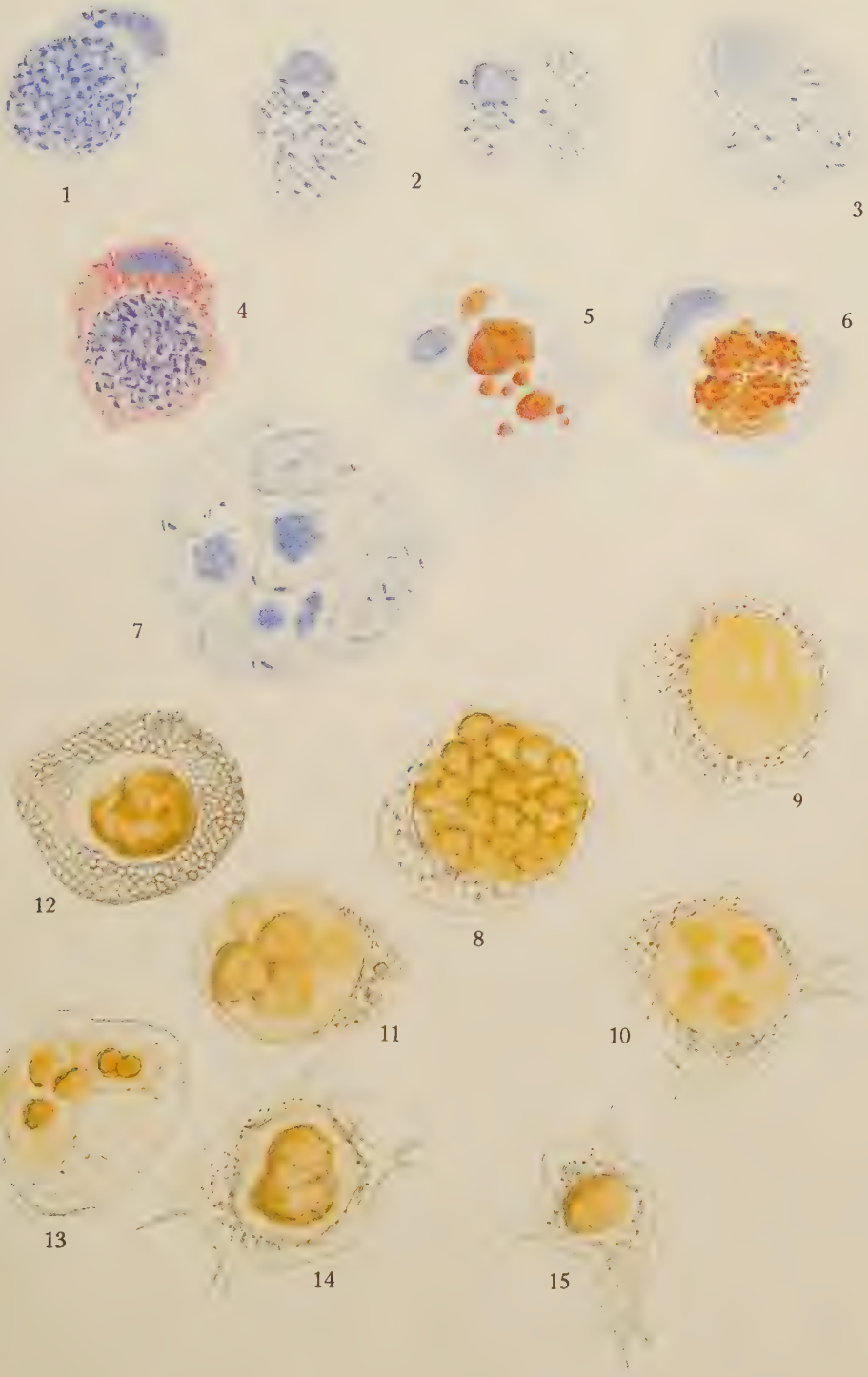

13

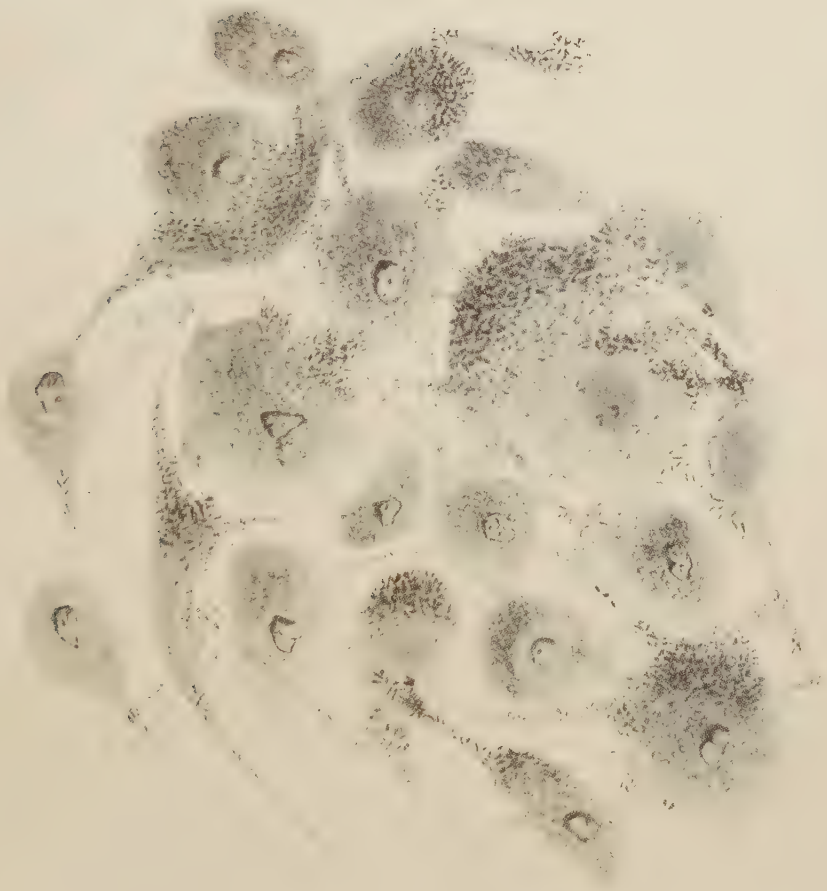

14

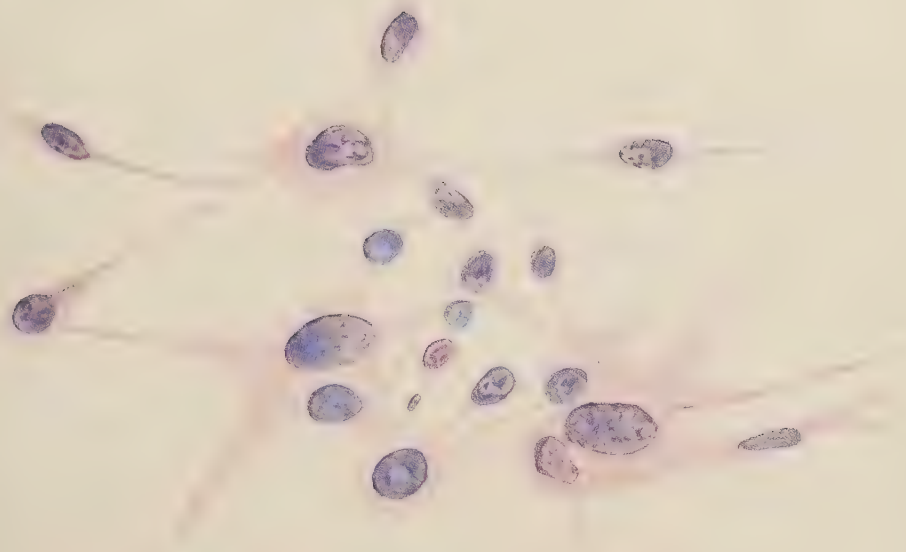




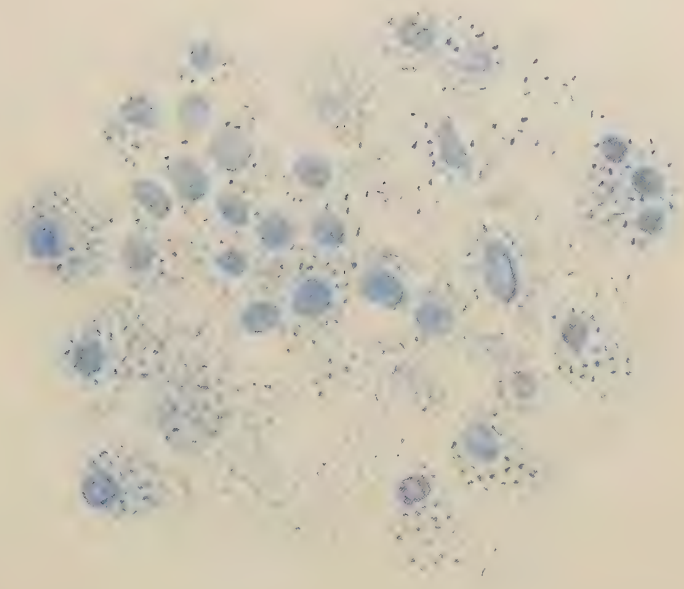

15


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

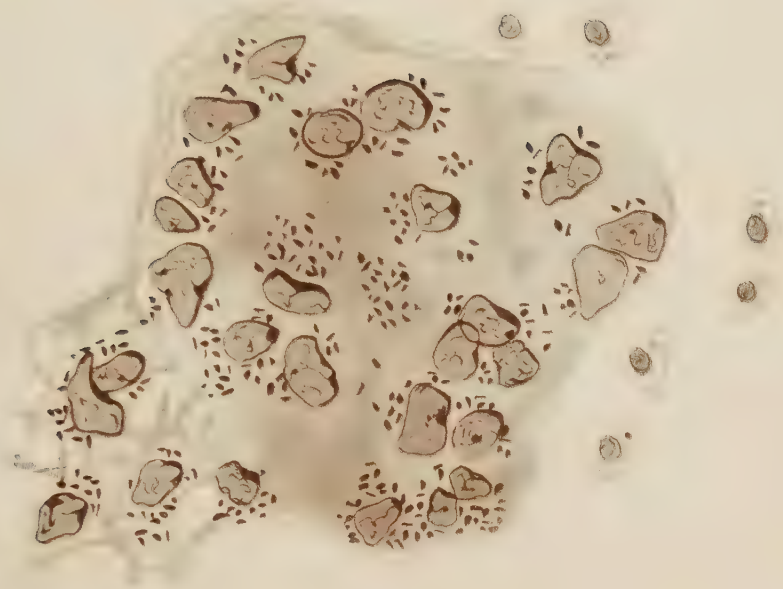




1



2

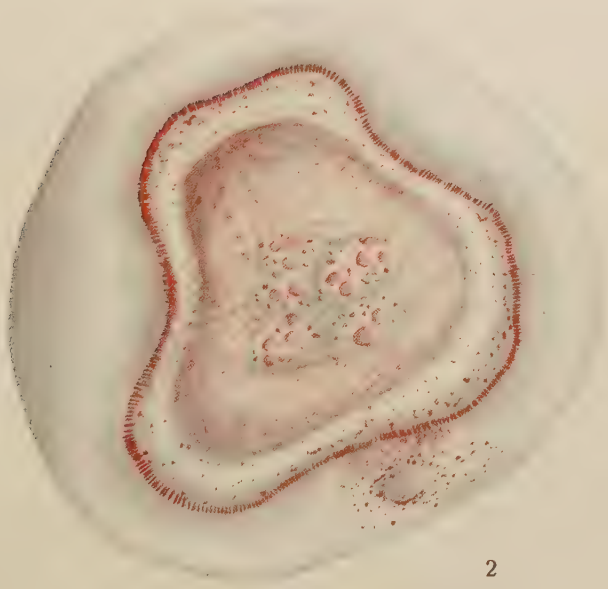


1

2

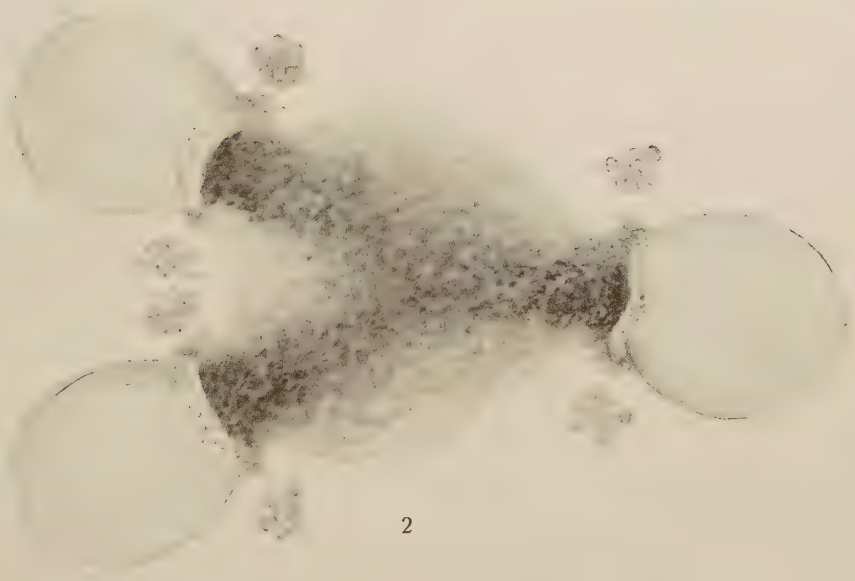
MASSON ET Cie, ÉDITEURS

1

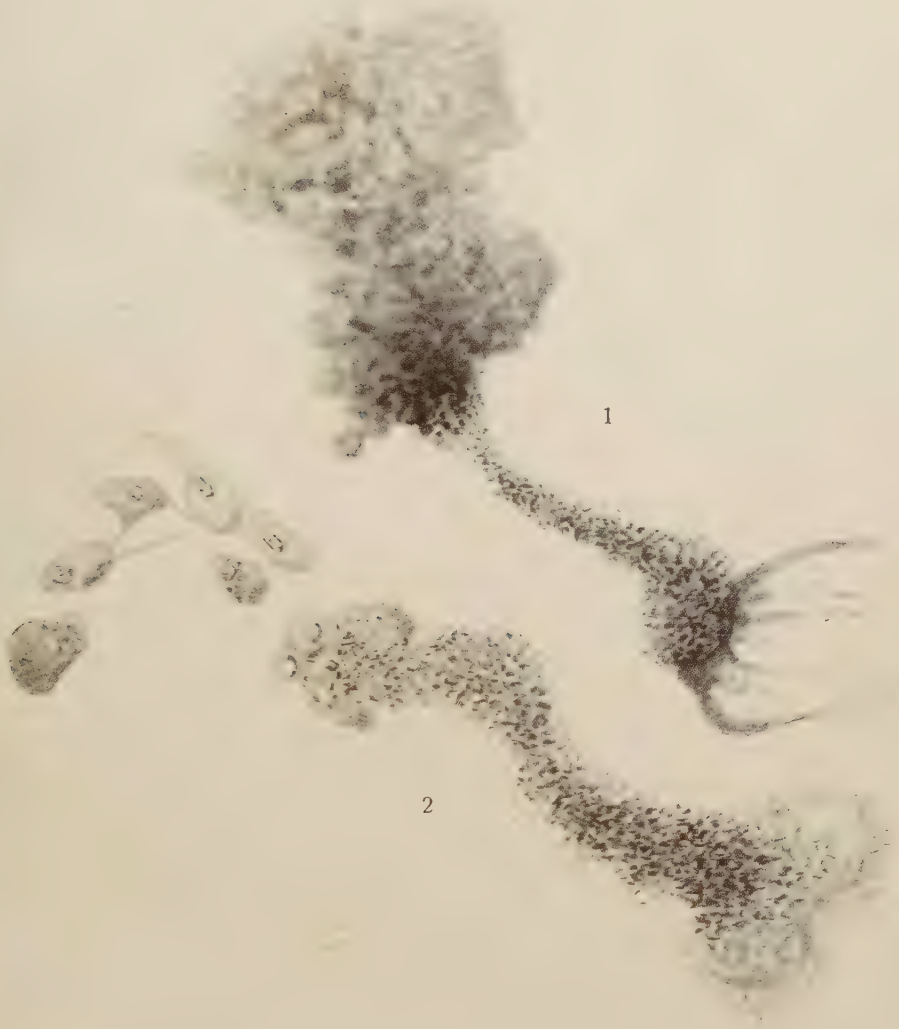


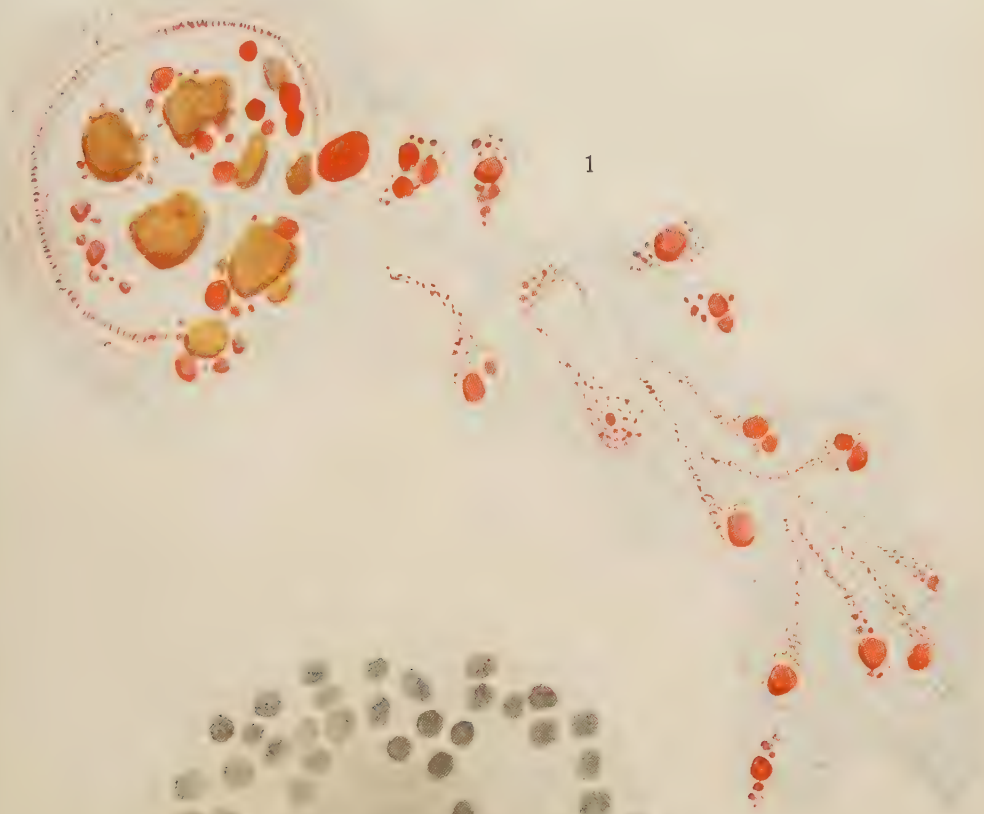
2

1



2


1
2



1

2

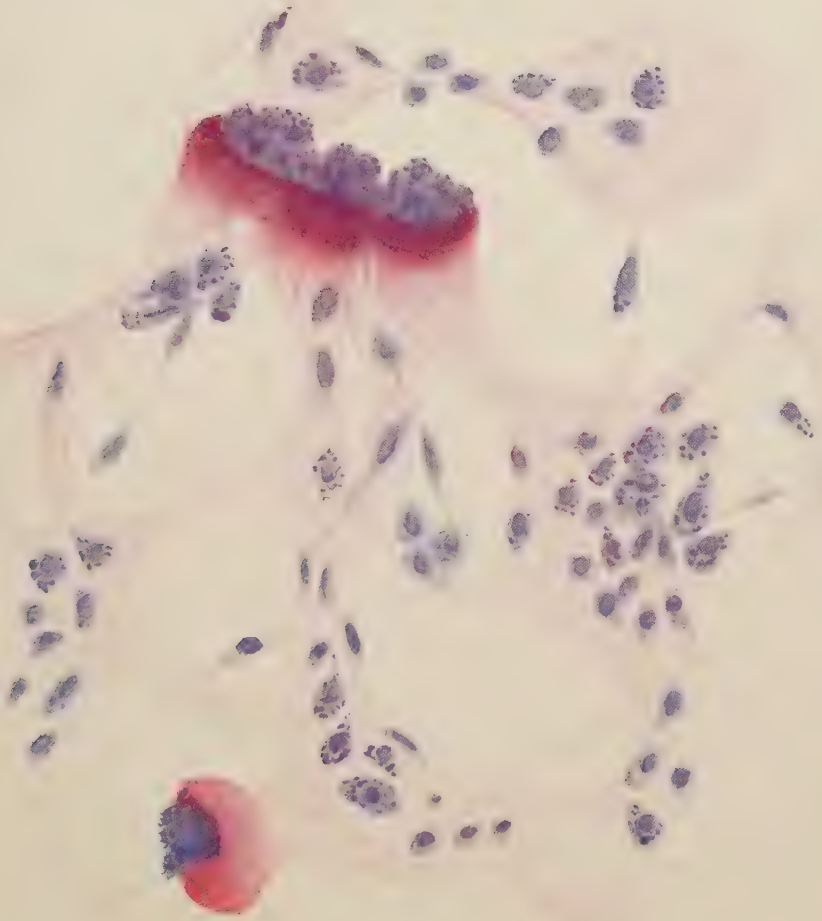
MASSON ET Cie, ÉDITEURS

1

2

3

4



1

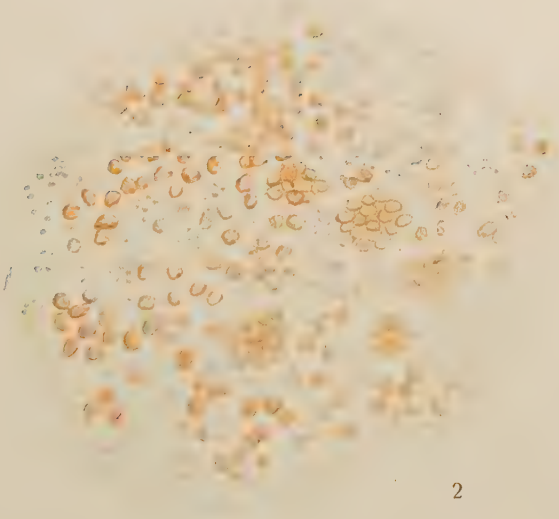
2

1

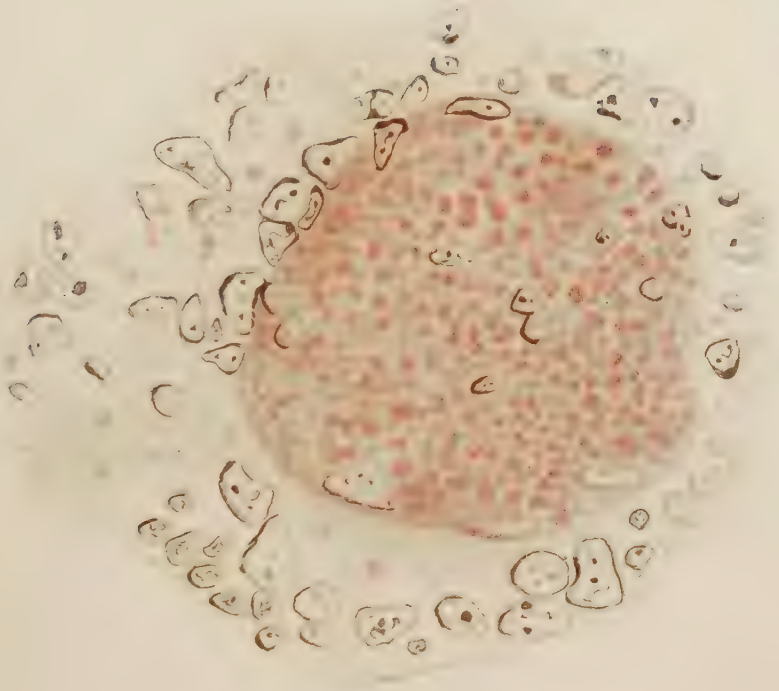
2

MASSON ET Cie, ÉDITEURS

1

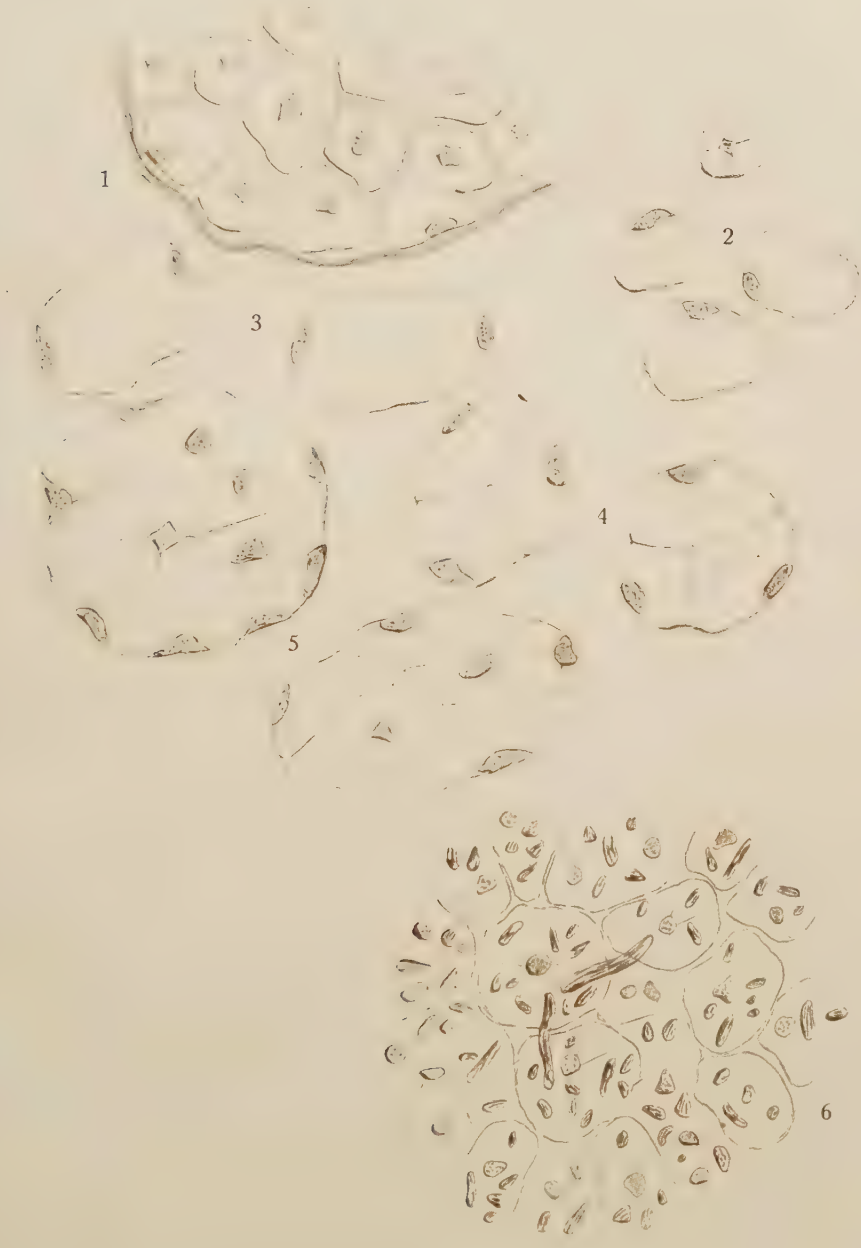


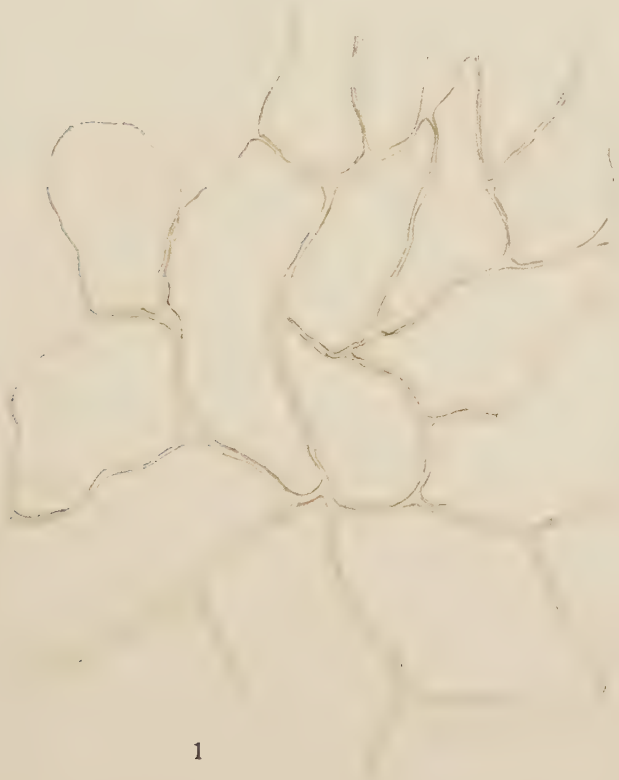
2



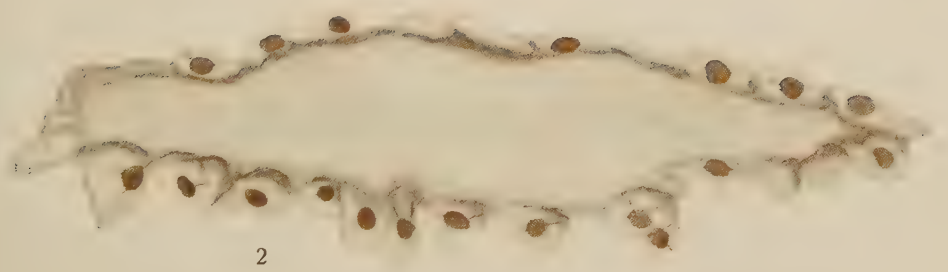
1

2

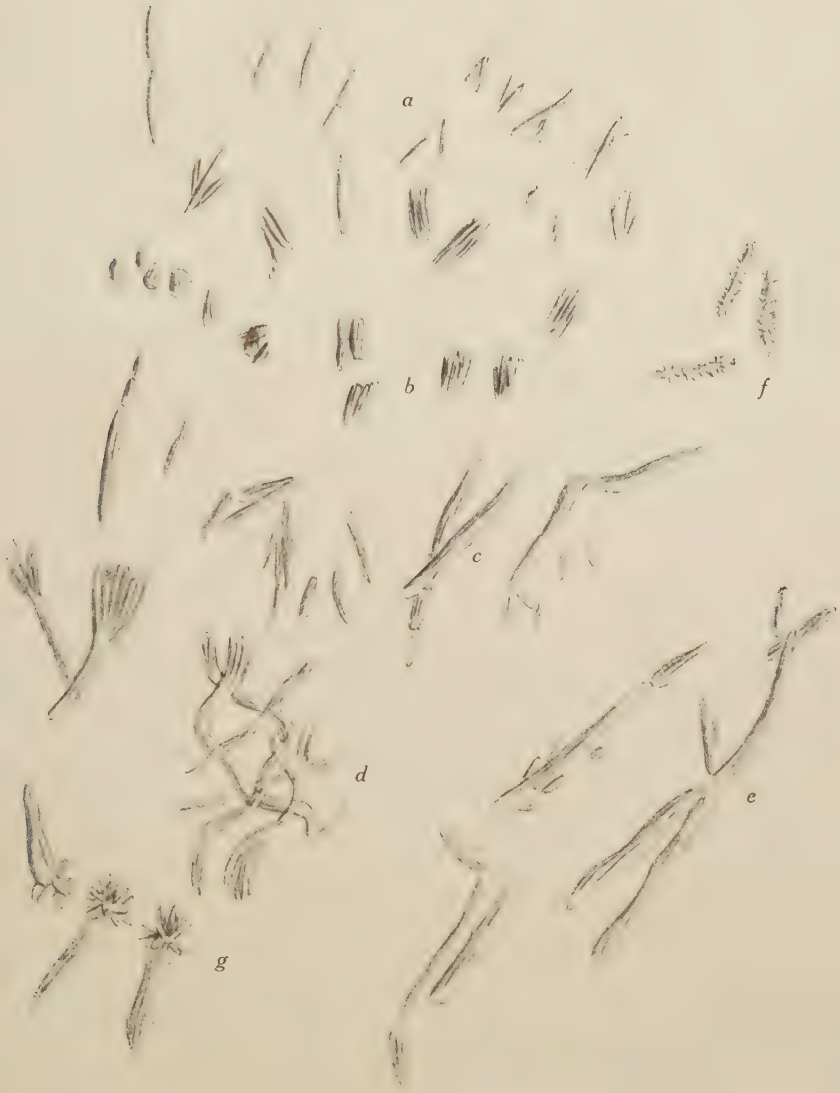

1
2
3
4
5
6



1



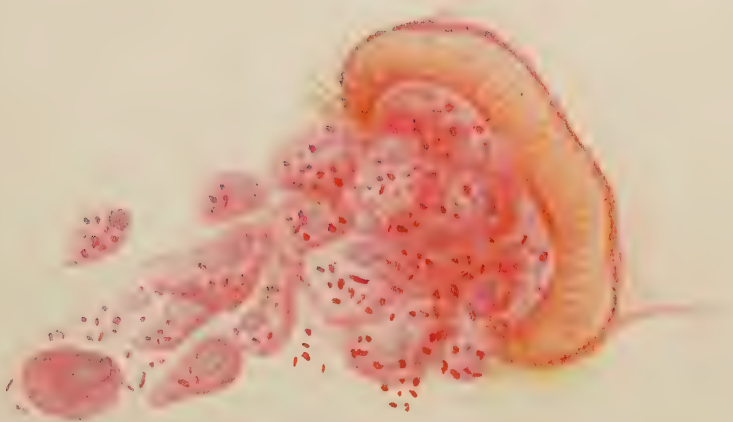
2


a
b
c
d
e
f
g

1

2

1



2

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR L'INFECTION CHARBONNEUSE ET L'IMMUNITÉ ANTICHARBONNEUSE

par

D. COMBIESCO

(Premier Mémoire)

La bactéridie charbonneuse est de tous les microbes celui qui est connu depuis plus longtemps (Davaine, 1850) ; malgré cela, son étude a fait l'objet dans ces dernières années de toute une série de recherches nouvelles. Cela est dû au fait que les recherches récentes sur le mécanisme de l'infection et de l'immunisation locales ont été faites surtout à l'aide de la bactéridie charbonneuse. C'est, en effet, l'infection par la bactéridie charbonneuse qui était prise par M. Besredka comme type d'une infection à laquelle ne sont sensibles qu'une catégorie strictement limitée de cellules de l'organisme ; c'est également à propos de cette infection que ce savant a édifié sa théorie d'une immunité strictement locale capable d'assurer celle de l'organisme tout entier.

La voie de pénétration d'un microbe pathogène dans l'organisme présente une importance considérable en ce qui concerne l'issue de la lutte qui va s'engager entre le micro-organisme et l'organisme envahi. Pour une même espèce microbienne et une même voie de pénétration, les résultats diffèrent d'une espèce animale à l'autre ; de même que, pour une espèce donnée, une même voie de pénétration donne des résultats très dissemblables lorsqu'on s'adresse à des microbes différents. C'est ainsi que le bacille typhique ou le vibrion cholérique sont très dangereux pour l'homme lorsqu'ils sont introduits par voie buccale, et inoffensifs jusqu'à un certain point lorsqu'on les introduit par voie sous-cutanée.

Il en est de même du bacille dysentérique, pour l'homme, mais

il n'en est pas de même pour les animaux du laboratoire et spécialement du lapin, qui supporte des quantités très grandes de bacille dysentérique administré par voie buccale et qui succombe, au contraire, s'il reçoit par voie intraveineuse ou sous-cutanée des quantités de bacilles infiniment plus petites (de 4000 à 5000 fois moins qu'il n'en faudrait pour les tuer par voie buccale).

Il y a longtemps que la voie de pénétration dans l'organisme du bacille charbonneux a fait l'objet des discussions des expérimentateurs. A la suite des travaux de Davaine et de Pasteur, on a admis que les voies les plus fréquentes de l'infection naturelle étaient la voie cutanée et la voie intestinale. La voie trachéale, admise par certains, a été niée par d'autres ; il en est de même pour la voie conjonctivale. En ce qui concerne l'homme, on a toujours considéré la voie pulmonaire comme l'une de celles par lesquelles la bactéridie charbonneuse peut facilement infecter l'organisme. C'est un fait connu que, chez un animal capable d'être infecté par une espèce microbienne donnée, par des voies diverses, le degré de sensibilité à l'infection varie considérablement d'une voie à l'autre. En ce qui concerne le charbon, on connaissait depuis longtemps le fait que, pour infecter un animal sensible, la voie cutanée demande un nombre de germes beaucoup moins grand que la voie intraveineuse ou intrapéritonéale.

Tel était l'état de nos connaissances lorsqu'en 1920 M. Besredka [**1**], à la suite de ses expériences sur l'infection charbonneuse et l'immunisation contre cette maladie, affirma que la peau constitue le seul organe sensible à cette infection, que les animaux qui meurent par le charbon n'en meurent que « par la peau ». En badigeonnant avec du virus charbonneux les animaux sensibles sur la peau rasée « toute piquetée de rouge », ces animaux prennent le charbon ; l'infection par voie cutanée est donc possible, affirmation soutenue d'ailleurs par les auteurs anciens. M. Besredka va beaucoup plus loin et soutient que l'on ne peut conférer une infection charbonneuse à un animal qu'à la condition de contaminer la peau. Sinon, l'infection devient impossible. Un cobaye qui serait complètement dépouillé de son revêtement cutané, affirme ailleurs cet auteur, deviendrait tout à fait insensible au charbon, et l'infection chez lui ne pourrait plus se produire.

Citons ici quelques-unes des expériences caractéristiques de M. Besredka :

1° Cobaye (460 gr.) reçoit en injection intratrachéale, sans que l'on souille la peau, un quart de centimètre cube de virus char-

bonneux en bouillon : survit sans avoir présenté la moindre réaction, ni locale ni générale ;

2° Cobaye (415 gr.) reçoit en injection intrapéritonéale, sans que l'on souille la peau, 2 centimètres cubes de virus charbonneux ; ne présente aucun trouble, survit ;

3° Cobaye (540 gr.) reçoit en injection intraveineuse, sans que l'on souille la peau, au moyen d'une très fine aiguille, un quart de centimètre cube de virus charbonneux dans les veines de l'oreille que l'on chauffe légèrement pour faire mieux apparaître les vaisseaux : nullement incommodé, l'animal survit indéfiniment.

Cette opération réussit plus facilement chez le lapin, auquel nous pouvons injecter impunément dans la veine marginale de l'oreille 1 centimètre cube de virus, en prenant les précautions d'usage et en cautérisant le point d'inoculation dès que la canule est retirée.

Ce savant conclut de ces expériences que, « chez le cobaye, n'existe en réalité qu'un seul organe sensible : l'appareil cutané ». Et plus loin : « ... la bactéridie, qui pénètre ailleurs que dans la peau ou le tissu sous-cutané, passe évidemment inaperçue de l'animal : aussitôt arrivée dans le péritoine et dans le poumon, elle y est phagocytée et digérée ». Pour bien comprendre ce qui va suivre, nous tenons à bien préciser ce que M. Besredka comprend par appareil cutané ; pour cela, nous reproduisons ses propres paroles : « ... par appareil cutané, nous entendons la peau proprement dite et *le tissu cellulaire,* dont il est impossible de la séparer ».

Telle est, très brièvement résumée, la théorie de M. Besredka ; un certain nombre de travaux exécutés sous son inspiration concluent dans le même sens.

M^lle^ Aïtof [**2**] constate que le virus charbonneux, déposé sur la muqueuse conjonctivale sans léser cette dernière, ne donne lieu à aucune infection, sauf chez les femmes enceintes et, dans ce dernier cas seulement, en employant du sang charbonneux.

Balteanu [**3**], dans le même ordre d'idées, a fait des expériences fort intéressantes qui confirment celles de Besredka en les enrichissant d'expériences nouvelles. Ces expériences exécutées sur le lapin et le cobaye par injection intraveineuse, intrapleurale ou intracardiaque, confirment les vues de M. Besredka. Il confirme encore ces dernières par une expérience fort ingénieuse exécutée au moyen de tubes capillaires contenant chacun 0 cc. 3 d'émulsion charbonneuse, puis fermés à la flamme aux deux extrémités

et introduits dans le péritoine ou sous la peau. Ces tubes sont introduits par un très petit orifice obtenu par ponction avec une pipette effilée. A travers la peau saine, il brise les tubes intrapéritonéaux au bout de trois jours et les tubes sous-cutanés au bout de vingt-quatre heures. Les animaux résistent, ce qui, selon l'auteur, se réduit au fait que la peau n'a pas été touchée par les microbes. Cet expérimentateur tire de ses expériences la conclusion que le tissu cellulaire sous-cutané lui-même est insensible à l'infection charbonneuse, conclusion contraire à l'opinion professée jusque-là par M. Besredka et qui détermine ce savant à restreindre la zone sensible au virus charbonneux au derme seul.

A la suite de ces expériences, auxquelles il faut ajouter celles de Urbain [**4**], Brocq Rousseu, Plotz [**5**], M. Vallée a fait rentrer l'infection charbonneuse dans le groupe des ectodermoses.

Les idées si originales émises à ce sujet par M. Besredka et ses collaborateurs étaient manifestement contraires aux conceptions admises jusque-là relativement à l'infection charbonneuse et à l'immunité dans cette maladie. Aussi nous a-t-il paru intéressant de soumettre le problème tout entier à une nouvelle série de recherches expérimentales, recherches que nous avons entreprises dans le but de nous éclairer nous-même et sans la moindre idée préconçue. Dans le présent mémoire, nous exposons les résultats de nos recherches expérimentales sur l'infection charbonneuse chez le lapin et le cobaye. Dans un mémoire prochain, nous traiterons du mécanisme d'immunité expérimentale dans cette maladie.

I

Nos premières expériences ont porté sur des faits déjà connus en partie ; il nous a semblé nécessaire de les répéter avant de nous faire une idée sur les différents processus qui se passent dans l'infection charbonneuse [**6**].

C'est ainsi que nous avons cherché d'une part à déterminer l'action exercée sur la virulence d'un bacille charbonneux par sa culture dans le sang total, le plasma ou les sérums normaux de cheval, de lapin, de mouton et d'homme (le bacille qui a servi à nos expériences tuait en injection sous-cutanée un lapin de 1500 à 2000 grammes en moins de soixante-douze heures à la dose de 1/30.000^{e} d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose). Pour nos ensemencements, nous employions comparati-

vement une bactérie n'ayant pas fait passage par animal et une bactérie animalisée (animalisée lapin), c'est-à-dire ensemencée directement du sang du cœur d'un lapin mort d'infection charbonneuse.

Dans ce second cas, la bactérie animalisée différait de la première par suite de son adaptation à l'organisme animal (encapsulement, etc.). Pour obtenir le sang total non coagulé, le sang était recueilli dans des éprouvettes paraffinées avec ou sans addition de citrate de soude et les animaux étaient saignés avec une aiguille paraffinée. Le plasma obtenu après centrifugation était conservé dans les mêmes conditions de température que le sang total. Au début, le sang simplement citraté se comportait au point de vue de nos expériences exactement de la même façon que le sang reçu dans les tubes paraffinés sans citrate ; plus tard, nous avons abandonné la méthode du paraffinage pour nous en tenir à celle de la citratation pure et simple. Quant au sérum obtenu par coagulation, il a été employé comparativement après ou sans chauffage à 56°.

a) Dans une série d'éprouvettes contenant des quantités égales de ces différents liquides, on ajoute 0 cc. 2 d'une émulsion de bacilles charbonneux. Les tubes ensemencés sont mis à 37° et examinés de temps en temps par la méthode des frottis et des ensemencements sur gélose. Nous avons pu de la sorte nous assurer que l'action sur la bactéridie charbonneuse de culture (1) du sang total, du plasma ou du sérum inactivé est tout à fait différente de celle qu'exerce le sérum frais non chauffé. Lorsque les bactéries ajoutées au sang total ne sont pas trop nombreuses, elles sont rapidement englobées et digérées par les phagocytes ; sitôt que leurs nombre dépasse certaines limites, une certaine quantité de bactéries reste non englobée et libre dans le liquide. Dans ce dernier cas, elles s'encapsulent rapidement et se multiplient énergiquement ; ensemencées sur gélose, elles donnent en dix-huit à quarante heures de très nombreuses colonies.

Dans le plasma normal ou dans le sérum inactivé, la bactéridie charbonneuse se développe facilement en formant des capsules. Nous insistons sur la rapidité impressionnante avec laquelle ces capsules se forment, le processus d'encapsulement étant terminé au bout de cinq à dix minutes. Ici également les ensemencements

(1) Nous désignons sous le nom de bactéridie de culture la bactéridie n'ayant pas fait le passage par animal, en opposition avec la bactéridie animalisée, retirée directement du sang de l'animal mort d'infection charbonneuse.

sur gélose donnent lieu en seize à vingt-quatre heures à des colonies très nombreuses.

Le tableau est tout différent lorsque l'ensemencement se fait dans du sérum non chauffé ; après cinq heures d'incubation à 37°, on ne voit plus sur les frottis la forme végétative; dans ces conditions, l'ensemencement sur agar donne lieu à des rares colonies isolées (deux à trois) et qui n'apparaissent que tardivement au bout de trente-six à quarante-huit heures. L'inoculation sous la peau d'un centimètre cube de sérum non chauffé ensemencé avec la bactéridie charbonneuse, au bout de cinq heures de séjour à 37°, ne donne lieu à aucune infection, alors que les cultures faites dans le sang total, le plasma et le sérum inactivé et conservé dans les mêmes conditions que ci-dessus, tuent le lapin à la dose de 0 cc. 1 sous la peau, en donnant lieu aux lésions classiques du charbon.

Des expériences identiques, exécutées, avec du liquide de vésicatoire recueilli chez l'homme, nous ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec le sang citraté ou le sang total.

Les résultats que nous venons de signaler ont été obtenus avec le sang, le plasma et le sérum des chevaux normaux. Le tableau varie un peu lorsqu'il s'agit de liquides prélevés chez d'autres animaux. Le lapin se comporte comme le cheval, mais son sérum a une action bactéricide plus active sur les bactéridies. Le mouton a une action moins énergique, tout au moins vis-à-vis du microbe employé par nous, et l'action des leucocytes est beaucoup moindre. C'est ainsi que, sur les frottis effectués avec les ensemencements en sang total, nous n'avons pas trouvé des microbes englobés par les phagocytes. Quant au liquide de l'homme, le tableau obtenu est intermédiaire entre celui qui est fourni par le mouton et le cheval, les leucocytes englobent les microbes des cultures, mais moins activement que les phagocytes de cheval ou de lapin.

Nous attachons une importance spéciale aux résultats obtenus au moyen du liquide de vésicatoire. En effet, lorsqu'il pénètre dans l'organisme à la suite d'une injection, le bacille charbonneux se trouve baigné dans un liquide qui n'a nullement la constitution physico-chimique du sérum et dont les propriétés sont bien plutôt comparables avec celles du liquide de vésicatoire ou du plasma sanguin. En effet, dans le liquide de vésicatoire, la bactéridie s'animalise pour peu qu'elle échappe à l'action de la phagocyte, ainsi que nous le montrent les expériences *in vitro* décrites plus haut.

Les expériences de culture en sang total, plasma, du sérum

chauffé ou non chauffé, citées plus haut ont été reprises par nous avec les liquides d'animaux présentant un haut degré de résistance à l'infection charbonneuse ; la poule et le pigeon, par exemple.

C'est ainsi que nous avons pu constater que, tandis que le sérum non chauffé de cobaye, de lapin, de cheval ou d'homme exerce sur les bactéridies une puissante action bactéricide, cette action devient nulle lorsque nous nous adressons au sérum frais de la poule ou du pigeon. Par contre, ensemencées dans le sang total de la poule ou du pigeon, les bactéridies sont détruites par les phagocytes bien plus activement que dans le sang des animaux sensibles, au point que, après cinq ou six heures de séjour à 37°, les ensemencements sur gélose ne donnent plus que de très rares colonies microbiennes et parfois aucune. Ceci est à rapprocher des faits observés par Metchnikoff [**7**] sur les rats âgés.

b) Dans une seconde série d'expériences, l'ensemencement, au lieu d'être fait avec des bacilles de cultures, se fait avec du sang du cœur récolté chez un lapin mort de charbon (deux gouttes de sang par tube de culture). Dans ce cas, le processus était très différent de celui décrit dans le paragraphe précédent. Sur les frottis faits avec les cultures en sang total, la phagocytose est nulle ; on ne trouve jamais le bacille englobé, tous sont libres, *encapsulés* et en voie de multiplication ; le passage sur agar donne de nombreuses colonies. Les ensemencements du sang du cœur sur plasma ou sérum inactivé donnent des bactéries ayant l'aspect de bacilles animalisés. Ensemencés dans le sérum non chauffé, les microbes animalisés se multiplient activement et l'ensemencement sur gélose donne lieu en dix-huit à vingt-quatre heures à des colonies très nombreuses.

Comme on le voit, les expériences décrites dans les deux paragraphes précédents confirment l'opinion des auteurs qui se sont occupés du mécanisme de l'encapsulement et de l'action bactéricide du sérum de différents animaux (Metchnikoff [**7**], Danysz [**8**], Spangaro [**9**], Bail [**16**], Gruber et Futaki [**10**], Preisz [**11**], Löhlein [**12**], etc.).

En même temps, elles posent l'important problème des relations qui s'établissent entre les bactéridies animalisées et l'organisme animal.

c) Cet ensemble de faits nous a conduit à répéter les mêmes expériences, mais cette fois-ci en employant comme milieux de culture les liquides récoltés chez les animaux hyperimmunisés (cheval et bœuf). Les recherches de Sawtchenko [**13**], Ascoli [**14**],

Sobernheim [**15**], Bail [**16**], Preisz [**17**], ont montré que le sérum anticharbonneux ne présente pas vis-à-vis de la bactéridie une action bactériolitique supérieure à celle obtenue avec le sérum normal de la même espèce animale. Pour ces recherches, nous nous sommes servi de microbes de cultures employés précédemment; comme microbes animalisés, nous nous sommes servi du sang de lapin ou du sang de cobaye morts de charbon (bacilles animalisés : lapins; bacilles animalisés : cobayes).

Ensemençant deux gouttes de sang de lapin ou de cobaye morts de charbon dans 10 centimètres cubes de sang de cheval hyperimmunisé, examinons les frottis à des intervalles différents : nous constaterons que cette fois-ci, et contrairement à ce qui se passait avec le sang normal, les phagocytes ont englobé les microbes animalisés (encapsulés). Au début de l'expérience, nous trouvons dans l'intérieur des polynucléaires, des bactéries dont la capsule se colore bien par le bleu Manson, alors que le filament microbien devient de moins en moins colorable. Plus tard, les phagocytes ne contiennent plus que des capsules vides métachromatiquement colorées en rose. Quant au plasma, il n'exerce aucune action lytique, tandis que le sérum non chauffé présente un pouvoir lytique des plus intenses. Néanmoins, on trouve toujours dans ce dernier liquide, aussi bien que dans le sang total, un certain nombre de microbes encapsulés qui ne sont pas englobés par les phagocytes et qui échappent à la lyse ; l'ensemencement sur gélose donne lieu à des colonies assez nombreuses.

Nous avons répété ces expériences en remplaçant le sang du cheval par celui du bœuf hyperimmunisé. Les résultats obtenus ont été les mêmes que ci-dessus avec la bactéridie animalisée (cobaye); ils sont différents pour la bactéridie animalisée (lapin). En effet, les frottis en sang total ensemencé avec la bactéridie animalisée (lapin) montrent qu'au bout de cinq heures d'étuve il n'y a aucun englobement par les phagocytes : les bactéridies sont encapsulées, libres et en voie de multiplication. Quant au sérum, il se comporte comme le sérum normal. Ainsi qu'on le voit, les phagocytes du bœuf hyperimmunisés se comportent tout à fait différemment selon qu'ils ont affaire à des bactéridies animalisées (lapin) ou animalisées (cobaye). On voit par là que le sérum de cheval hyperimmunisé est plus actif vis-à-vis de la bactéridie que le sérum de bœuf hyperimmunisé, ce qui, d'autre part, semble être confirmé par les recherches cliniques expérimentales, qui montrent la supériorité du sérum de cheval immu-

nisé contre le charbon comparativement au sérum de bœuf.

Des expériences qui précèdent on peut tirer un certain nombre de conclusions relativement à la signification biologique de la capsule chez le bacille charbonneux. J'ai pu me convaincre, au cours de mes expériences, que la capsule n'est pas l'unique facteur qui exerce sur les leucocytes un chimiotactisme négatif ou qui empêche la lyse de se produire ; ces phénomènes, en effet, dépendent aussi partiellement de la virulence propre du microbe encapsulé. C'est ainsi que, dans certaines conditions, la bactéridie du vaccin I de Pasteur est capable de former des capsules tout en restant phagocytable par les leucocytes normaux, alors que les bactéridies virulentes après la sécrétion de la capsule ne sont plus phagocytées par les cellules qui étaient capables de les englober avant l'apparition de cette dernière. De même, ainsi que nous l'avons vu plus haut, une même souche microbienne employée comme bacille animalisé (lapin), puis comme bacille animalisé (cobaye), donne lieu de la part des leucocytes à des réactions différentes, le chimiotactisme étant positif vis-à-vis des premières et négatif vis-à-vis des autres. Ce fait nous montre que pour une même souche microbienne, aussi bien au point de vue physiologique qu'au point de vue physique (Furst [**17**]), la capsule doit être considérée comme étant la résultante de deux facteurs au moins : l'un invariable et fourni par la cellule bactérienne elle-même, l'autre variable et dépendant de la constitution chimique du milieu ambiant. Nous avons vu plus haut que même les microbes virulents non encapsulés ne sont pas en état d'échapper à l'action phagocytaire ; d'autre part, la capsule à la constitution de laquelle ont pris part les liquides de l'organisme (W. Hollmann [**18**]), n'empêche pas à elle seule l'action phagocytaire de se produire. De la sorte, le chimiotactisme positif ou négatif des bactéridies encapsulées résulterait de l'action combinée des substances élaborées par le microbe d'une part, et de celles fournies par les humeurs à la capsule elle-même.

II

Les expériences préliminaires que nous avons citées dans le chapitre précédent nous montrent avec quelle rapidité la bactéridie charbonneuse s'adapte aux conditions nouvelles de vie dans les milieux de culture albumineux ; nous avons relevé également la rapidité avec laquelle se forment les capsules (en petit nombre de minutes). A la lumière de ces premiers résultats, nous

avons essayé d'interpréter le mécanisme de l'infection charbonneuse chez le lapin et chez le cobaye et de déterminer quel rôle la peau joue dans cette infection.

a) Une première série d'expériences porte sur l'infection par voie intraveineuse.

Expérience 1. — Quatre lapins reçoivent respectivement dans la veine auriculaire 0,1, 0,5, 1 et 2 centimètres cubes d'une émulsion de bacilles charbonneux (culture sur gélose vingt-quatre heures, émulsionnée dans 10 centimètres d'eau physiologique). Nous avons observé pour l'inoculation les précautions recommandées par M. Besredka (cautérisation). Les lapins ayant reçu 1 et 2 centimètres cubes sont morts au bout de deux et quatre jours sans avoir présenté au point d'inoculation le moindre œdème et la moindre lésion quelconque; ceux à 0 cmc. 1 et 0 cmc. 5 ont définitivement résisté.

Expérience 2. — Là nous nous sommes servi d'animaux qui, en général, sont considérés comme réfractaires à l'infection charbonneuse, tels les pigeons adultes. Quatre pigeons reçoivent par voie intraveineuse, avec les précautions indiquées plus haut, des doses progressives d'une même émulsion de bacilles charbonneux, à savoir: 0,25, 0,5, 1 et 2 centimètres cubes. Les pigeons qui ont reçu les fortes doses sont morts en cinq à huit jours, les autres ont résisté définitivement. Ceci nous prouve que, même chez les animaux présentant une résistance prononcée, le nombre des microbes inoculés joue un rôle considérable.

Les expériences exposées plus haut nous permettent, croyons-nous, jusqu'à un certain point, d'interpréter les résultats précédents. Nous avons vu, en effet, que si la quantité de microbes ensemencés dans le sang citraté est assez grande, une partie seulement est phagocytée, tandis que le reste forme des capsules et se multiplie. Or, dans les expériences ci-dessus, nous voyons que ni les lapins ni les pigeons inoculés dans la veine avec de fortes doses n'ont été capables de détruire la totalité des microbes, leurs phagocytes étant débordés par le grand nombre de bactéridies injectées. Dans ces conditions, les microbes demeurés libres se sont encapsulés et leur multiplication n'étant plus empêchée, les animaux ont succombé à l'infection. J'ai suivi la marche des phénomènes chez l'animal vivant. Deux lapins sont inoculés dans les veines en prenant les précautions nécessaires respectivement avec 2 et 0,1 centimètres cubes de l'émulsion microbienne.

Pendant les premières vingt-quatre heures, j'ai examiné métho-

diquement leur sang à des intervalles variables; dans le premier cas (2 cmc.), on rencontrait sur les frottis des microbes libres et encapsulés ; dans le second cas (0 cmc. 1), l'examen est resté constamment négatif. Le premier animal a succombé, le deuxième a survécu. Comme on le voit, ces expériences confirment celles de M. Besredka et de ses élèves, à la condition toutefois que la quantité de microbes injectés ne soit pas trop grande. Les expériences ci-après vont nous démontrer le rôle très grand que jouent les microbes « animalisés » dans l'infection expérimentale par voie intraveineuse. Je saigne un lapin normal, une partie du sang est recueillie dans un ballon contenant une solution de citrate de Na ; on laisse l'autre partie se coaguler dans le but d'obtenir du sérum. Trois éprouvettes reçoivent l'une 5 centimètres cubes de sang total citraté, l'autre 5 centimètres cubes de sérum non chauffé, et la troisième 5 centimètres cubes de sérum inactivé par chauffage pendant trente minutes à 56°. Chacun de ces tubes est ensemencé avec une quantité égale d'émulsion bactérienne (0 cmc. 2). Les tubes sont mis à 37° avec un tube témoin contenant du bouillon et ensemencé également. Au bout de deux heures de séjour à 37°, on fait avec le contenu de chacun des tubes des ensemencements sur gélose. Vingt-quatre heures plus tard, je constate que le nombre de colonies qui se sont développées sur le tube ensemencé avec le sang total est infiniment plus grand que celui fourni par l'ensemencement du sérum non chauffé. Les colonies provenant du sérum inactivé se rapprochent comme nombre de celles fournies par le sang total. L'examen sur lame des cultures, en sang total et en sérum inactif, nous montre de nombreuses formes encapsulées dans le sang et dans le sérum inactivé, alors qu'il est impossible d'en découvrir dans le sérum non chauffé. Avec les cultures développées dans le sang total et le sérum, j'ai inoculé des animaux dont je donne plus loin les observations.

Lapin n° 1 (poids 2400 gr.). — Avec toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination de la peau (cautérisation), l'animal reçoit dans la veine marginale de l'oreille 0 cmc. 1 de la culture en sang total. Il meurt au bout de soixante heures environ. A l'autopsie, on ne trouve pas le moindre œdème, ni au point d'inoculation, ni dans un autre point du tissu cellulaire sous-cutané. L'aspect général est celui de la septicémie charbonneuse classique (aspect caractéristique du sang, rate grosse et diffluente, congestion des organes, et en particulier du foie) ; l'examen microscopique démontre l'infection charbonneuse.

Lapin n° 2 (2075 gr.). — Avec les mêmes précautions, il reçoit dans la veine 0 cmc. 1 de la culture en sang total. On le trouve mort en moins de quarante-huit heures. A l'autopsie, absence totale d'œdème au point d'inoculation ou dans un autre point du tissu cellulaire sous-cutané. Septicémie charbonneuse, avec pneumonie charbonneuse au lobe inférieur gauche.

Lapin n° 3 (1150 gr.). — Reçoit dans la veine 0 cmc. 25 de la culture en sérum chauffé ; mêmes précautions au point d'inoculation. Il meurt en moins de quarante-huit heures. A l'autopsie, on ne constate aucun œdème dans le tissu sous-cutané ou au point d'inoculation; par contre, une congestion hémorragique du lobe inférieur gauche. La rate est congestionnée sans être très augmentée de volume ; les bacilles sont beaucoup plus nombreux dans les frottis du poumon que dans les frottis de rate.

Lapin n° 8 (1075 gr.). — Même expérience qu'avec le lapin n° 3, mais la dose injectée est plus faible (0 cmc. 1) de culture en sérum chauffé. Il meurt en cinquante-deux heures. A l'autopsie, mêmes constatations que pour le numéro 3.

Lapin C (1500 gr.). — Reçoit dans la veine 1 centimètre cube d'une culture faite en sérum non chauffé. *Aucune précaution n'a été prise pour éviter l'infection de la peau au point d'inoculation.* L'ensemencement sur une plaque d'agar de 0 cmc. 1 de cette culture nous a fourni trois cents colonies. Il faut admettre, par conséquent, que 1 centimètre cube de la culture contenait au moins trois mille bactéries. *L'animal résiste indéfiniment.*

Deux lapins (n° 33, 1910 gr., et n° 336, 1810 gr.) reçoivent par voie intraveineuse l'un 0 cmc. 2, l'autre 0 cmc. 1 d'une culture en sang total citraté (ensemencé sur agar à 0 cmc. 2 et 0 cmc. 1 et donnent respectivement douze cents et cinq cent cinquante colonies). Les animaux sont morts en quarante-huit heures : ce qui nous démontre que, dans le cas du lapin C, il ne peut être question d'une quantité trop faible de bactéries inoculées.

Lapin D (1250 gr.). — Même expérience que pour le lapin C, avec en plus la cautérisation du point d'inoculation. L'animal résiste définitivement.

Lapin E (1815 gr.) et *lapin F* (1500 gr.). — Reçoivent respectivement, sans cautérisation simultanée, 0 cmc. 25 et 0 cmc. 1 d'une culture en sérum non chauffé. Mêmes résultats qu'avec les lapins C et D.

Depuis, j'ai répété en partie les expériences précédentes en remplaçant comme milieu de culture le sang de lapin par du

sang humain citraté. Les résultats ont été identiques aux précédents. Cette dernière expérience a porté sur trois lapins.

Les résultats obtenus peuvent être résumés dans le tableau suivant :

N° du lapin	Quantités inoculées	Cautérisation au point d'inoculation	Résultats	Observations
N° 1 (2475 gr.)....	0.1 cult. sang total	+	mort 60 h.	Sans œdème local
N° 2 (2075 gr.) ...	0.1 cult. sang total	+	mort 48 h.	»
N° 3 (1150 gr.)....	0.25 cult. sér. inact.	+	mort 48 h.	»
N° 8 (1075 gr.)....	0.1 cult. sér. inact.	+	mort 52 h.	»
C (1500 gr.).....	1 cmc. cult. sér. actif	—	survie	
D (1250 gr.).....	1 cmc. cult. sér. actif	+	»	
E (1875 gr.).....	0.25 cc. cult. sér. act.	—	»	
F (1500 gr.).....	0.1 cc. cult. sér. act.	—	»	
N° 5 (1500 gr.)....	0.25 cc. cult. sang homme	+	mort 48 h.	sans œdème local
N° 6 (1250 gr.)....	0.25 cc. cult. sang homme	+	mort 60 h.	»
N° 7 (1875 gr.)....	0.1 cc. cult. sang homme	+	mort 72 h.	»
N° 335 (1910 gr.) .	0.2 cc. cult. sang lapin citraté	—	mort 48 h.	1.200 colonies sur agar.
N° 336 (1810 gr.) .	0.1 cc. cult. sang lapin citraté	—	mort 48 h.	550 colonies sur agar

Les expériences précédentes nous démontrent :

1° Que l'infection charbonneuse par voie intraveineuse est possible en dehors de toute intervention de la peau ;

2° Que la quantité de microbes inoculés a une importance très grande : dans ce dernier cas, en effet, les éléments de défense, en particulier les phagocytes, sont facilement débordés et bon nombre de bactéridies échappent à leur action ; les bactéries restées libres acquièrent des propriétés nouvelles qui leur permettent de résister, propriétés que les auteurs allemands ont désigné sous le nom « d'animalisation ».

Comme conséquence des expériences précédentes, j'ai essayé de reproduire l'infection charbonneuse par l'inoculation directe dans divers organes. C'est ainsi que j'ai entrepris une série de recherches suggérées par les expériences anciennes de Nocard sur le chien. Le chien présente en général une résistance très prononcée à l'infection charbonneuse expérimentale lorsque l'inoculation a lieu par voie sous-cutanée ; il meurt au contraire très rapidement si l'inoculation se fait directement dans le poumon. D'autre part, l'on sait que si les résultats des expérimentateurs sont loin de concorder lorsque l'inoculation se fait par la voie d'inhalation, cette même voie semble permettre à coup sûr l'infection lorsque la trachée ou le poumon ont été préalablement lésés; c'est ainsi que Snell reproduit toujours la maladie expérimentale par inhalation après traumatisme exercé sur la muqueuse trachéale.

Voici le résumé de nos expériences: trois lapins et trois cobayes furent inoculés en plein parenchyme pulmonaire à travers la paroi thoracique, après que toutes les précautions nécessaires ont été prises pour préserver la peau (cautérisation au point d'inoculation avant et après cette dernière). Nos animaux reçurent chacun 0 cmc. 1 d'une émulsion bactérienne. Six autres animaux (trois lapins, trois cobayes) furent inoculés avec les mêmes doses à travers le diaphragme. Dans ce but, nous avons fait une petite incision dans la paroi abdominale à travers laquelle, avec une aiguille flambée, nous avons pénétré dans le poumon en traversant le diaphragme. Après cautérisation des lèvres de la petite plaie, celle-ci a été suturée en appliquant par-dessus un pansement aseptique (teinture d'iode). Tous nos animaux sont morts en vingt-quatre à quarante heures, de septicémie charbonneuse. Aucun de nos animaux d'expérience n'a présenté le moindre œdème au niveau du point d'inoculation; au contraire, on a constaté chez tous une pleurésie séro-sanguinolente avec liquide très abondant, pleurésie que nous n'avons jamais eu l'occasion de rencontrer chez les animaux morts à la suite de l'infection sous-cutanée.

Une autre série d'expériences a été faite, par des procédés identiques et portant sur le même nombre d'animaux, en inoculant directement dans le foie et dans la rate. Dans tous ces cas, les animaux sont morts de septicémie charbonneuse sans présenter le moindre œdème au niveau du point d'inoculation. Il est clair, après cela, que, contrairement à l'opinion émise par M. Besredka, des organes autres que la peau sont sensibles à l'infection charbonneuse.

Rappelons à ce propos les intéressantes expériences de Roger et Garnier [**19**], qui ont infecté expérimentalement des lapins par inoculation directe de bacilles charbonneux, soit dans une branche de la veine porte, soit directement dans l'artère de l'intestin grêle (1). Remarquons que dans les expériences de ces savants les lapins inoculés dans la rate résistaient lorsque la quantité inoculée était faible, mouraient lorsque celle-ci était plus forte.

III

La grande majorité des expérimentateurs qui se sont occupés de l'infection charbonneuse constatent à quel point est énergique le chimiotactisme positif que les bactéridies exercent sur les phagocytes. C'est grâce à ce chimiotactisme que s'explique la résistance à l'infection charbonneuse que l'on observe après les injections intrapéritonéales.

En conséquence, nous nous sommes demandé si, en mettant les bactéries charbonneuses pour quelque temps à l'abri de l'action phagocytaire de façon à leur permettre de s'adapter aux conditions de résistance de l'organisme, « de s'animaliser » en un mot, nous ne pourrions pas réaliser l'infection expérimentale, même par des voies relativement peu sensibles, la voie intrapéritonéale par exemple. Dans ce but, nous nous sommes servi, mais en la modifiant, de la technique employée par Balteanu. Dans une première série d'expériences, les tubes capillaires introduits dans le péritoine de cobayes ou de lapins avaient une longueur de 10 à 12 centimètres. Au lieu de les fermer aux deux extrémités comme l'avait fait Balteanu, nous fermions une des extrémités à la lampe, l'autre extrémité restait ouverte ou bien était fermée au moyen d'un peu d'ouate hydrophile. Nous introduisions l'émulsion bactérienne dans ces tubes capillaires au moyen d'une pipette Pasteur très effilée et nous les remplissions jusqu'à 1 centimètre de distance de l'ouverture libre ; cette dernière était flambée avant d'être introduite dans le péritoine de l'animal. Jusqu'au moment de leur emploi, ces tubes capillaires avaient été stérilisés et conservés dans des grandes boîtes de Petri. Au moment de les employer, on les enveloppait dans de

(1) La bactéridie introduite par une branche de la veine porte, c'est-à-dire par une veine intestinale, ne provoque aucun trouble notable. Dans le réseau capillaire de l'intestin, la bactéridie trouve les conditions favorables à son développement.

l'ouate imbibée d'alcool, afin d'éviter une péritonite par infection secondaire. Nous introduisions ces tubes dans le péritoine des cobayes et des lapins que nous sacrifions à différents intervalles, afin de nous rendre compte de l'état de la réaction inflammatoire à leur intérieur.

C'est ainsi que nous avons pu nous convaincre que, chez les animaux sacrifiés depuis vingt-quatre à quarante heures, le tube était obturé par un long bouchon leucocytaire qui cependant ne dépassait pas 1 centimètre de longueur. Au delà, des leucocytes avaient pénétré dans la colonne liquide, parfois jusqu'au fond de cette dernière et sans former bouchon compact. Souvent aussi, nous avons vu l'épiploon venir compléter l'obturation en s'appliquant à l'extrémité ouverte des tubes capillaires. L'examen microscopique du contenu du tube nous a fait voir que les résultats obtenus variaient selon la longueur du tube employé : au niveau du bouchon leucocytaire, compact, les bactéries étaient phagocytées sans exception ; plus au fond, celles que n'avaient pas atteint les phagocytes s'étaient encapsulées au contact des humeurs.

Ces faits une fois constatés, nous avons passé à l'expérience suivante : un lot de dix lapins et de huit cobayes reçurent chacun dans la cavité péritonéale un tube capillaire rempli de bactéries et préparé comme nous l'avons dit plus haut. Pour introduire le tube dans le péritoine, nous opérions comme suit : au moyen d'une pipette très effilée, nous pratiquions dans la portion sus-pubienne de l'abdomen une ponction pénétrant dans la cavité péritonéale ; par le minuscule orifice ainsi obtenu, les pipettes étaient introduites dans la cavité, puis on appliquait sur l'orifice une pointe de feu. Ensuite l'animal était laissé au repos deux, trois ou quatre jours, après lesquels nous brisions en plusieurs morceaux les tubes à travers la peau de la paroi abdominale intacte. L'animal prenait une infection charbonneuse mortelle toutes les fois que l'animalisation des bactéridies avait pu se faire à l'intérieur des tubes. Lorsque, pour des motifs divers, cette animalisation ne s'était pas produite, l'animal restait indemne. A l'autopsie des animaux morts d'infection, l'on trouvait une péritonite séro-sanguinolente avec nombreux bacilles charbonneux, de plus un œdème considérable de l'épiploon et du mésentère. Aucun œdème sous-cutané au point d'introduction du tube.

Nous avons obtenu des résultats identiques et tout à fait aisés à contrôler lorsque nous introduisons les tubes non plus dans le péritoine, mais dans le tissu cellulaire sous-cutané. Dans ce cas,

les animaux ainsi traités prennent à coup sûr l'infection mortelle ; ceci est dû vraisemblablement au fait que sous la peau la réaction phagocytaire s'accomplit beaucoup plus lentement que dans le péritoine (1).

On peut conclure de tout ce qui précède que l'infection charbonneuse est *toujours possible par voie intrapéritonéale ou voie sous-cutanée toutes les fois que, par un procédé quelconque, nous parvenons à empêcher une destruction trop rapide des germes par les phagocytes ; de cette façon, nous donnons aux bactéries la faculté de s'encapsuler avant que l'organisme n'ait eu le temps de mobiliser ses éléments de défense.*

Il est infiniment probable qu'un processus analogue se produit lors de l'infection expérimentale par voie cutanée. Dans ce cas, la structure histologique de la peau favorise l'infection bactérienne, non pas grâce à l'hypothétique action de présence de cellules spécifiquement sensibles et mal définies quant à leur nature, mais bien par la possibilité qui est offerte aux bactéries contenues dans les espaces lacunaires du derme d'échapper pour quelque temps à l'action phagocytaire. C'est ce que nous démontre l'étude histopathologique de la peau de cobaye badigeonnée sur la surface rasée au moyen d'une émulsion bactéridienne virulente.

En effet, si après le badigeonnage sur la peau rasée on prélève à divers intervalles des fragments de peau que l'on coupe après fixation et inclusions à la paraffine, on fait les constatations suivantes :

Immédiatement après le badigeonnage, l'on constate à la surface du derme une quantité énorme de bactéries. Dès les premières minutes, les petits vaisseaux se congestionnent et la diapédèse commence à se produire. On observe facilement le phénomène de margination. d'abondantes leucocytes formant une couche continue à la surface des parois internes des vaisseaux ; à ce moment, bon nombre d'entre eux ont émigré vers la surface cutanée et contiennent des microbes en abondance. Ce processus

(1) Que l'on opère, par voie intrapéritonéale ou par voie sous-cutanée, il est nécessaire de fragmenter les tubes capillaires en plusieurs morceaux. Notons aussi la nécessité, si l'on veut réussir, de ne pas laisser les tubes capillaires séjourner trop longtemps (dix à douze jours, par exemple), dans le péritoine ou le tissu cellulaire sous-cutané, car dans ce dernier cas la rupture des tubes ne donne plus lieu à aucune infection. On sait, en effet, depuis les travaux de Sanarelli [**21**] et Pekelharing [**20**] (travaux que nous avons contrôlés nous-même), que les spores ne se produisent pas au sein de l'organisme dans des cavités closes laissées au contact des humeurs. Or, dans ces circonstances, au bout de quelques jours, les bactéries sont complètement lysées.

est déjà bien apparent cinq minutes après l'inoculation; dix à quinze minutes après le badigeonnage, le derme tout entier est envahi par des leucocytes bourrés de microbes. Un certain nombre de bactéries cependant sont restées libres. Au bout d'une demi-heure, toutes les bactéries non englobées, d'ailleurs assez rares, sont sans exception entourées d'une forte capsule. A partir de ce moment, l'englobement cesse de se faire. Au bout de cinq heures, on constate nettement une multiplication des bacilles restés libres, cette génération nouvelle étant exclusivement composée de bacilles encapsulés. Au bout de douze à vingt-quatre heures, la multiplication des bactéries est des plus actives : ces dernières forment des chaînettes d'individus encapsulés ; ces filaments microbiens constituent en s'entrecroisant un véritable mycélium qui, à travers le derme, pénètre dans le tissu cellulaire sous-cutané, puis dans les vaisseaux. A ce moment, bien que la réaction inflammatoire soit intense et que de très nombreux leucocytes soient présents à tous les étages et spécialement à la surface de la peau, tout processus de phagocytose est arrêté. Il n'y a plus d'englobement dans les cellules migratrices et les bactéries restent toutes libres. Les micro-organismes, que rien n'arrête plus, se multiplient activement ; l'œdème local qui avait commencé à apparaître dès les premières heures devient de plus en plus abondant, et l'on voit se dessiner sous les yeux le tableau bien connu de l'infection charbonneuse.

Ces dernières constatations ne font que confirmer l'hypothèse par laquelle nous expliquons le rôle favorisant de la peau sur l'infection charbonneuse ; de même que dans les cultures faites dans le sang complet, de même que dans nos expériences faites au moyen des tubes capillaires introduits dans l'organisme, ici aussi nous assistons à l'encapsulement et à « l'animalisation » des bactéries introduites dans le derme pour peu qu'elles aient échappé à l'action des phagocytes. Or, cet encapsulement se fait avec une remarquable rapidité dans les lacunes du derme, alors que l'action phagocytaire, toute rapide qu'elle soit, est cependant encore trop lente pour empêcher « l'animalisation » de se produire. Il y a là simplement l'application locale d'une loi biologique très générale, sans qu'il soit nécessaire pour expliquer ces phénomènes, qu'on peut suivre au microscope, d'invoquer une sensibilité spécifique des cellules de la peau à l'infection charbonneuse.

IV

D'ailleurs, toute une série de recherches, faites en même temps que les nôtres ou bien ultérieurement, ont montré que la peau est bien loin d'être le seul organe sensible à l'infection charbonneuse, et que l'on peut infecter les animaux directement par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou intrapulmonaire. La plupart des auteurs à qui nous faisons allusion ont donné du mécanisme de l'infection charbonneuse par voie cutanée une interprétation qui ne diffère pas de la nôtre. C'est ainsi que Bachmann, Beltrami et Romat [**22**] ont infecté des lapins et des souris par voie intraveineuse. Chez le lapin, immédiatement après l'injection faite dans la veine auriculaire, ces auteurs sectionnent au thermocautère l'extrémité de l'oreille ; les animaux meurent en trois jours de septicémie sans présenter de l'œdème local. Ils inoculent les souris par voie intraveineuse à l'extrémité de la queue, puis sectionnent cette dernière à la base avec le thermocautère dix, vingt, trente minutes après l'inoculation. Tous les animaux meurent. Les expérimentateurs expliquent les différences qui s'observent entre les résultats obtenus par eux et ceux de Besredka, par la différence de virulence des races employées.

Boquet [**23**] réalise l'infection charbonneuse chez des cobayes inoculés sous la muqueuse linguale ou directement dans le tissu musculaire en prenant, bien entendu, les précautions locales nécessaires. Il ajoute : « Ces faits montrent que la peau, dont la grande réceptivité a été mise en évidence par Besredka, n'est pas le seul tissu sensible au charbon. »

Gratia [**24**] a eu entre les mains une race de bactéridie charbonneuse qui donne naissance, dans les milieux de culture, à deux types parfaitement tranchés et facilement isolables : l'un qui donne en bouillon des cultures agglutinées avec dépôt floconneux au fond du tube ; l'autre qui donne une culture homogène avec bacilles bien dissociés, isolés ou en courtes chaînettes. Le premier type (culture agglutinée) donne d'une façon constante l'infection charbonneuse par voie intraveineuse, toutes les précautions locales étant préalablement prises. En expérimentant avec l'autre type, et dans les mêmes conditions que précédemment, un seul lapin sur neuf a pris l'infection mortelle ; le dernier a montré à l'autopsie deux ganglions axillaires présentant un œdème à leur périphérie. Le liquide d'œdème ensemencé en bouillon a fourni une culture homogène, alors que celle faite en partant du sang du cœur a fourni une bactérie du type agglutiné.

Cette intéressante expérience montre tout à la fois l'importance que prennent les variations microbiennes dans l'infection charbonneuse, et nous prouve en même temps que la participation de la peau n'est nullement indispensable pour réaliser l'infection charbonneuse.

Cernaianu et Suhateanu [**25**], opérant sur des cobayes et des lapins, montrent que la sensibilité à l'infection charbonneuse va en décroissant d'un tissu à l'autre selon l'échelle suivante : cerveau, peau et muqueuses, plèvre, sang, foie, péritoine.

Adelheim et Kaklin [**26**] montrent que l'on peut infecter des animaux par voie méningée sans toucher à la peau.

Corona [**27**] montre, dans ses expériences sur les lapins, que les muqueuses, aussi bien que la peau, sont sensibles à l'infection charbonneuse ; les membranes séreuses, comme le péritoine, sont également sensibles, moins toutefois que la peau et les muqueuses.

Sobernheim et Murrata [**28**] réussissent à infecter des cobayes par voie sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale et stomacale. L'infection primitive de la peau ne constitue pas une condition nécessaire. Des dosages minutieux de l'antigène leur ont montré qu'il n'existe pas des différences sensibles entre la sensibilité du derme et celle du tissu cellulaire sous-cutané. Selon ces auteurs, de toutes les voies la plus sensible est l'intramusculaire ; les voies intraveineuses et intrapéritonéale sont celles qui présentent le minimum de sensibilité.

Wollmann [**29**], expérimentant sur les cobayes, montre « que la souillure de la peau favorise l'infection de façon remarquable, elle ne la conditionne pas » ; et ailleurs, « la réceptivité au charbon n'est donc pas dévolue à la peau seule ».

Vikotchikoff [**30**], répétant les expériences de Combiesco, obtient des résultats identiques pour les voies intraveineuses ou pulmonaires ; il conclut en affirmant que la réceptivité des organes internes chez le lapin est relative et directement en fonction de la dose inoculée.

Dans une série de communications, et en particulier dans son mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur,* Sanarelli [**31**] passe en revue les différentes théories émises à propos du mécanisme de l'infection charbonneuse et discute les expériences de Besredka. Au moyen d'une ingénieuse expérience qui consiste à injecter directement par voie nasale des spores charbonneuses dans les poumons, il montre que l'infection par la voie pulmonaire est possible; il démontre également que d'autres organes,

comme la rate, par exemple, sont directement sensibles à l'infection charbonneuse. Le même auteur nous apporte une intéressante interprétation relativement à la pathogénie du charbon dit interne et montre l'importance que présentent une série d'agents physiques (froid, etc.) ou chimiques (arsenic, quinine, acide lactique, etc.) dans le déclanchement de l'infection.

Basset [**32**] entreprend une série d'expériences en se servant tantôt de spores charbonneuses, tantôt de formes végétatives; il montre que la voie dermique est plus sensible que la voie épidermique, mais moins sensible que la voie sous-cutanée ; à doses égales, en effet, l'injection dans le tissu cellulaire sous-cutané provoque une mort plus rapide.

Müller [**33**] nous apporte une série d'expériences fort élégantes par lesquelles il démontre la possibilité de l'infection par voie péritonéale : un œuf de pigeon vidé de son contenu, puis stérilisé, est rempli à moitié avec une culture de charbon virulente ; on obstrue l'orifice et l'on introduit l'œuf dans le péritoine d'un lapin. La plaie abdominale se cicatrise en quelques jours. L'animal meurt au bout de cinq semaines, alors qu'il ne peut plus être question d'une infection au niveau de l'incision cutanée. A l'autopsie, on constate une infection charbonneuse généralisée. Même résultat si l'on remplace l'œuf par une bougie Chamberland. En introduisant des œufs semblablement préparés dans des ballons de bouillon, on obtient au bout de quelques jours une culture de la bactéridie issue de l'œuf au niveau du point d'occlusion.

Citons enfin, dans le même ordre d'idées, le travail d'A. Lumière et de M^me^ Montoloy [**34**], qui reproduit l'infection chez le lapin par voie péritonéale. Ces expérimentateurs introduisent dans le péritoine de cobayes des sacs de collodion ensemencés au moyen d'une culture charbonneuse. Au bout de huit jours, alors que la cicatrisation de l'incision abdominale est complète, on rompt le sac. Tous les animaux ainsi traités sont morts de septicémie charbonneuse sans trace d'œdème au niveau de la cicatrice opératoire ; des cobayes témoins inoculés directement dans le péritoine avec la même dose ont résisté.

Les auteurs tirent de leurs expériences la conclusion suivante : « Il suffit d'empêcher la phagocytose par un moyen quelconque pour voir les phénomènes rentrer dans le cadre des autres infections, sans qu'il soit nécessaire, pour expliquer l'exception apparente de la bactéridie charbonneuse, de recourir à une propriété spécifique inexistante des cellules cutanées. »

Terminons en rappelant la classique expérience de Pasteur relative à la poule réfrigérée, la réfrigération suspendant l'immunité charbonneuse. Cette expérience suffirait à elle seule pour démontrer qu'il n'est nullement besoin d'invoquer l'action favorisante des cellules sensibles ; le travail de Werigo montre clairement que, dans le cas de Pasteur, la résistance de l'animal à l'infection charbonneuse et la suspension de cette résistance à la suite de la réfrigération est uniquement fonction de la réaction phagocytaire.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° Chez l'animal normal, les leucocytes du sang englobent les bactéridies charbonneuses virulentes et montrent un chimiotactisme négatif pour les bactéridies encapsulées. Placées dans du sérum normal non chauffé, les bactéridies charbonneuses sont lysées, alors que les mêmes bactéridies encapsulées ne le sont pas;

2° Chez l'animal hyperimmunisé, les phagocytes englobent les bactéries virulentes encapsulées ;

3° L'action chimiotactique négative exercée par les bactéries encapsulées sur les leucocytes de l'animal normal est due à l'action combinée de la capsule et de la bactérie elle-même : en effet, une bactéridie atténuée est englobée par les phagocytes, alors même qu'elle est encapsulée ; une bactéridie virulente non encapsulée l'est également ; mais la phagocytose n'a plus lieu en présence d'un microbe encapsulé et doué de virulence ;

4° La peau ne constitue pas le seul organe sensible à l'infection charbonneuse : le poumon, la rate, le foie, le sang, constituent autant de voies par lesquelles l'infection charbonneuse est possible ;

5° La peau demeure, il est vrai, l'organe le plus sensible à l'infection charbonneuse (constatation d'ailleurs dès longtemps connue) ; mais cette sensibilité doit s'expliquer par le fait que, dans cet organe, les bactéridies, ou tout au moins un certain nombre d'entre elles, échappent pour un temps à l'englobement par les phagocytes. Or, de toutes les expériences qui précèdent il résulte clairement qu'il suffit de mettre pour un temps relativement très court la bactéridie à l'abri de l'action phagocytaire pour lui donner le temps de « s'animaliser », et par conséquent d'échapper à ces dernières. A cet égard, nos expériences, exécutées au moyen des tubes capillaires introduits dans le péritoine ou sous la peau, nous semblent tout à fait démonstratives.

BIBLIOGRAPHIE

1. Besredka (A.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1921, XXXV, 421 ; — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1920, LXXXIII, 769 ; 1923, LXXXIX, 1156.
2. Mlle Aïtof. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1922, XXXVI, 567.
3. Balteano (J.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1922, XXXVI, 805.
4. Brocq-Rousseu et Urbain. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1924, XC, 369.
5. Plotz (H.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1924, XXXVIII, 169.
6. Combiesco (D.). — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1923, LXXXIX, 637, 634, 640.
7. Metchnikoff. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, I, 321 ; 1890, IV, 65, 193.
8. Danysz. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, XIV, 641.
9. Spangaro (S.). — *Centralbl. f. Bakt.*, 1905, XXXVI, 83.
10. Gruber u. Futaki. — *Centrabl. f. Bakt.*, 1906, XXXVIII, 12.
11. Preisz (H.). — *Centralbl. f. Bakt.*, 1908, XLVII, 585 ; 1910, LV, 503.
12. Löhlein. — *Centralbl. f. Bakt.*, 1906, XXXVIII, 32.
13. Sawtchenko. — Cité par Sobernheim, *Handbuch der Path. Mikroorg.* ; Kolle und Wassermann (Milzbrand), 1903.
14. Ascoli. — Id.
15. Sobernheim. — Id.
16. Bail. — *Centralbl. f. Bakt.*, 1903, XXXIII, 343 ; 1904, XXXVII, 270 ; 1908, XLVI, 488 ; 1915, LXXV, 159 ; 1915, LXXVI, 38, 330.
17. Fürst. — *Centralbl. f. Bakt.*, 1910, LXI, 97.
18. Holmann (W.-L.). — *Journal of Pathology and Bacteriology*, 1914-1915, XIX, 478.
19. Roger (H.) et Garnier (M.). — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1905, LVII, 863.
20. Pekelharing. — *Semaine Médicale*, 1892, 503.
21. Sanarelli (J.). — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, VII, 820.
22. Bachmann (A.), Beltrami (P.) et Romat (A.). — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1923, LXXXIX, 1122.
23. Boquet (A.). — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1924, XC, 72 ; — *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1924, CLXXVIII, 260.
24. Gratia (A.). — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1924, XC, 369.
25. Cernaianu et Suhateanu. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1924, XC, 869.
26. Adelheim u. Kaktin. — *Klin. Wochenschr.*, 1924, XXXVIII, 1721.
27. Corona. — *Pathologica*, 1924, XVI, 389.
28. Sobernheim u. Murata. — *Zeitschr. f. Hyg.*, 1924, CIII, 691.
29. Wollmann. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, XCII, 127.
30. Wigotschikoff. — *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1925, XLII, 105.
31. Sanarelli (J.). — *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1924, CLXXIX, 937, 1100.
32. Basset. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, XCIII, 413.
33. Müller. — *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1925, XCIII, 1243.
34. Lumière (A.) et Mme Montoloy. — *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 1926, CLXXXII, 594.

TRAITEMENT DE LA MALARIA PAR LE STOVARSOL

par

M. CIUCA et I. ALEXA

(Travail de l'Hopital de maladies contagieuses «Izolarea» de Jassy)

Marchoux avait démontré l'action exclusive du stovarsol sur le *plasmodium vivax* en utilisant des petites doses de médicament par voie buccale ou endoveineuse (0 gr. 37 pour les enfants ; 1 gr. chez les adultes). Dans les conditions de l'expérimentateur, les formes pigmentées du plasmodium vivax disparaîtraient de la circulation plus vite que les formes jeunes.

Valenti et Tomasseli avaient obtenu des résultats encourageants dans un cas de quarte et dans un cas de tierce bénigne.

Foley, Cataneï, Brouard et Leblanc ont essayé avec succès le stovarsol par voie buccale chez les porteurs chroniques de plasmodium vivax. Les formes schizogoniques, aussi bien que les gamétocytes, disparaissent en deux ou trois jours.

Nous avons repris ces recherches en utilisant des fortes doses de stovarsol, afin de nous rendre compte si le stovarsol ne pourrait remplacer un traitement prolongé par la quinine, très chère actuellement et dont la production diminue tous les ans.

Les premiers cas de malaria traités avec du stovarsol par voie buccale nous ont vite déterminés à renoncer à cette méthode pour deux raisons : d'une part, l'action du médicament était beaucoup trop lente ; d'autre part, les symptômes d'inflammation rénale étaient plus fréquents que chez les malades qui étaient traités par voie endoveineuse.

Nous avons donc utilisé le stovarsol sodique en injections intraveineuses, en commençant toujours par une première dose d'essai de 25 centigrammes. Les doses administrées ont varié de 25 centigrammes à 16 grammes, sans dépasser la dose journalière de 1 gr. 50. Une prise de sang était faite matin et soir pendant

toute la période du traitement ; l'examen cytologique et chimique des urines était exécuté journellement.

Nos résultats n'auront d'autre valeur que pour juger de l'action thérapeutique immédiate du médicament ; la plupart de nos malades ne sont plus revenus à l'hôpital après avoir fini leur traitement. Ces mêmes résultats nous permettront, par contre, de tirer des conclusions sur la tolérance de l'organisme vis-à-vis de cette substance.

Qu'il nous soit permis de remercier le professeur Fourneau et le docteur Nicolau, qui ont mis à notre disposition le stovarsol sodique et le stovarsol en pastilles préparés par la maison Poulenc.

TIERCE BÉNIGNE

D. Pl..., vingt-quatre ans. Récidive. Rate n° 2, accès journaliers, *présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.* Les parasites disparaissent après une première injection intraveineuse de *stovarsol sodique de 25 centigrammes* ; la rate diminue : n° 1 à la sortie de l'hôpital. Treize jours après, le malade revient à l'hôpital : *nouvelle récidive* ; pas de congestion rénale.

R. E..., deux ans et demi. Infection primaire, forme pernicieuse ; méningisme, rate n° 1 ; 40° de fièvre ; adynamie, *sang très parasité : schizontes et gamétocytes.*

Quantité totale de stovarsol administré par voie buccale : *65 centigrammes* en trois doses consécutives : 15 centigrammes le premier jour, les deux jours suivants une dose de 25 centigrammes. Les schizontes disparaissent après la première dose, les gamétocytes vingt-quatre heures plus tard (après la seconde dose). La malade quitte l'hôpital, sur l'insistance de ses parents, cinq jours plus tard, sans fièvre et en bon état général. Ne revient plus à l'hôpital. Pas de congestion rénale.

B. H..., treize ans. Infection primaire, accès journaliers, *présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang* ; rate n° 2. Quantité de stovarsol administrée dans la veine : *75 centigrammes en deux doses. Après la première dose de* 25 centigrammes, les schizontes disparaissent, la température baisse ; les gamétocytes disparaissent quarante-huit heures après. Le malade quitte l'hôpital après sept jours sans fièvre, sans parasites, rate n° 1, et ne revient plus.

A. D..., seize ans. Récidive. Accès journaliers, rate n° 1 : *présence de schizontes dans le sang.* 75 centigrammes de stovarsol sodique dans une seule injection intraveineuse ; disparition des parasites après cette première dose. Une légère *congestion rénale* nous oblige de continuer le traitement avec de la quinine : quatre jours de suite, 1 gramme par jour en cinq doses. Le malade quitte l'hôpital sept jours après et ne revient plus.

A. C..., vingt-quatre ans. Infection primaire. Accès à un jour d'intervalle ; *présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang* ; rate

n° 3 ; forte anémie, conjonctives sous-ictériques, herpès labial. Traitement : *1 gramme de stovarsol* sodique en deux injections (25 centigr. le premier jour ; 75 centigr. le lendemain). Les parasites (schizontes et gamétocytes) persistent après la première injection et ne disparaissent que douze heures après la seconde injection. Le malade quitte l'hôpital cinq jours après : *absence de parasites* ; rate n° 2 ; pas de congestion rénale ; n'est plus revenu à l'hôpital.

I. F..., quatorze ans. Récidive. Accès tous les deux jours ; forte anémie, adynamie totale, rate douloureuse, *congestion rénale. Présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.*

Traitement. — 12 mars 1925 : 1 gramme de stovarsol par voie buccale.

13 mars 1925, parasitisme du sang non modifié, 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

14 mars 1925, absence de parasites, 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

15 mars 1925 : 50 centigr. de stovarsol.

En tout : 1 gr. 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine : 1 gramme par voie buccale.

Quitte l'hôpital le 18 mars : état général amélioré, absence de parasites ; *les lésions de néphrite persistent.*

Le malade n'est plus revenu à l'hôpital.

Z. M..., trente et un ans. Récidive. Accès tous les deux jours ; rate douloureuse n° 2, anémie, présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.

Traitement : 12 avril 1925 : 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

13 avril 1925 : 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

Au total : 1 gr. 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

15 avril 1925, absence de parasites, rate à peine diminuée, absence de lésions rénales. Le malade quitte l'hôpital sans retour.

V. M..., vingt et un ans. Récidive. Accès à un jour d'intervalle, rate douloureuse n° 2, anémie, sous-ictère conjonctival, *présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.*

Traitement : 15 mai 1925 : 75 centigr. de stovarsol.

16 mai 1925 : les parasites persistent, symptômes d'irritation rénale.

17 mai 1925 : absence de parasites ; 50 centigr. de stovarsol sodique.

Au total : 1 gr. 25 de stovarsol sodique.

18 mai 1925 : forte congestion rénale ; 1 gramme de sulfate de quinine.

19 mai 1925 : absence d'albumine et d'éléments inflammatoires dans le sédiment urinaire ; 1 gramme de sulfate de quinine. Le malade quitte l'hôpital sans retour.

P. Str..., trente-cinq ans. Récidive. Accès journaliers, légère congestion rénale, rate douloureuse n° 2, sous-ictère, *présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.*

Traitement : 7 avril 1925 : 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine ; huit heures après, absence de parasites.
8 avril 1925 : absence de parasites ; 1 gramme de stovarsol sodique dans la veine ; le soir, forte inflammation rénale.
Au total : 1 gr. 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
9 avril 1925 : absence de parasites, 1 gramme de sulfate de quinine.
10 avril 1925 : même état.
11 avril 1925 : même état.
12 avril 1925 : le malade quitte l'hôpital : rate n° 2, meilleur état des reins.

St. R..., vingt-trois ans. Récidive. Fièvre continuelle, présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.

Traitement : 1er juin 1925 : 75 centigr. de stovarsol sodique.
2 juin 1925 : gamétocytes, albuminurie : 1 gramme de stovarsol sodique.
Au total : 1 gr. 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
3 juin 1925 : absence de parasites : inflammation rénale.
4 juin 1925 : même état, 1 gramme de sulfate de quinine.
5 juin 1925 : même état.
6 juin 1925 : même état.
7 juin 1925 : quitte l'hôpital sans retour.

Nic. Most..., dix-neuf ans. Récidive. Accès espacés d'un jour, rate n° 1, présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.

Traitement : 16 mai 1925 : 25 centigr. de stovarsol ; le soir, absence de parasites.
17 mai 1925 : 50 centigr. de stovarsol.
18 mai 1925 : 50 centigr. de stovarsol.
19 mai 1925 : quitte l'hôpital.
En tout : 1 gr. 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

Par. Const..., vingt-deux ans. Infection primaire, accès tous les deux jours, présence de schizontes et de gamétocytes dans le sang.

Traitement : 22 avril 1925 : 1 gramme de stovarsol par voie buccale.
23 avril 1925 : schizontes et gamétocytes dans le sang ; 1 gramme de stovarsol par voie buccale.
24 avril 1925 : absence de parasites, 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
25 avril 1925 : absence de parasites ; pas d'inflammation rénale.
En tout : 2 grammes de stovarsol par voie buccale ; 75 centigr. dans la veine (stovarsol sodique).
Cette malade, faisant partie du personnel de l'hôpital, a été sous notre observation trois mois ; pendant cet intervalle, on n'a plus trouvé de parasites. On n'a pas constaté non plus d'inflammation rénale.

Vic. Ch..., dix-neuf ans. Infection primaire, accès journaliers, *présence de schizontes et de gamétocytes.* Rate n° 2.

Traitement : 30 avril 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique ; le soir, présence de parasites.

1er mai 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol sodique ; le soir, absence de parasites.
2 mai 1925 : absence de parasites.
4 mai 1925 : quitte l'hôpital, rate n° 1.
17 mai 1925 : *revient à l'hôpital ; présence de schizontes et de gamétocytes, accès journaliers,* rate n° 2.
18 mai 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique ; le soir, présence de parasites.
19 mai 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol sodique; le soir, absence de parasites.
20 mai 1925 : absence de parasites, 1 gramme de stovarsol sodique.
21 mai 1925 : absence de parasites : 1 gramme de stovarsol sodique.
22 mai 1925 : la malade quitte l'hôpital, légère congestion rénale, rate n° 1.
Au total : 4 grammes de stovarsol sodique dans la veine.

Ift. Vas..., dix-sept ans. Récidive. Accès tous les deux jours, rate n° 1, présence de schizontes et de gamétocytes.

Traitement : 1er juin 1925 : 75 centigr. de stovarsol sodique ; le soir, présence de parasites.
2 juin 1925 : absence de parasites ; 1 gramme de stovarsol sodique.
3 juin-5 juin 1925 : repos, absence de parasites.
5 juin 1925 : absence de parasites : 75 centigr. de stovarsol sodique.
6 juin 1925 : même état : 75 centigr. de stovarsol sodique.
7 juin 1925 : même état, même dose.
8 juin 1925 : le malade quitte l'hôpital ; pas de lésions rénales.
Au total : 4 grammes de stovarsol sodique dans la veine.

I. Cul..., dix-huit ans. Infection primaire ; accès espacés d'un jour, rate n° 1, présence de schizontes et de gamétocytes.

Traitement : 1er juin 1925 : 75 centigr. de stovarsol sodique ; le soir, présence de parasites.
2 juin 1925 : absence de parasites ; 1 gramme de stovarsol sodique.
3 juin 1925 : absence de parasites.
4 juin 1925 : absence de parasites ; 1 gr. stovarsol.
5 juin 1925 : même état, 75 centigr. de stovarsol.
6 juin 1925 : même état, même dose.
Au total : 4 gr. 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
7 juin 1925 : le malade quitte l'hôpital ; rate percutable ; pas de lésions rénales.

G. Mor..., dix-huit ans. Récidive. Accès tous les deux jours ; rate n° 3, présence de schizontes et de gamétocytes.

Traitement : 13 mars 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique ; le soir, présence de gamétocytes.
14 mars 1925 : présence de gamétocytes ; 75 centigr. de stovarsol sodique.
15 mars 1925 : absence d'hématozoaires ; 75 centigr. de stovarsol.
16 mars 1925 : même état, 1 gr. 25 de stovarsol.
17 mars 1925 : même état, 1 gr. 50 de stovarsol.

18 mars 1925 : le malade quitte l'hôpital ; rate percutable ; absence de parasites; pas de lésions rénales.
En tout : 4 gr. 50 de stovarsol sodique dans la veine.

T. Pr..., soixante-quatre ans. Récidive. Accès à un jour d'intervalle ; rate n° 1, présence de schizontes et de gamétocytes.

Traitement : 1er juin 1925 : 75 centigr. de stovarsol.
2 juin 1925 : absence de parasites ; 1 gramme de stovarsol.
3 juin 1925 : même état, même dose.
4 juin 1925 : même état, même dose.
5 juin 1925 : même état, même dose.
6 juin 1925 : le malade quitte l'hôpital ; rate percutable.
En tout : 4 gr. 75 de stovarsol sodique dans la veine.

D. Chit..., vingt-cinq ans. Infection primaire, rate n° 1, présence de schizontes et de gamétocytes.

Traitement : 28 mai 1925 : 50 centigr. de stovarsol.
29 mai 1925-31 mai 1925 : absence de parasites.
1er juin 1925 : absence de parasites ; 1 gramme de stovarsol.
2 juin 1925 : même état, même dose.
3 juin 1925 : absence de parasites ; 1 gramme de stovarsol.
4 juin 1925 : même état, même dose.
5 juin 1925 : même état, 75 centigr. de stovarsol.
6 juin 1925 : même état, même dose.
7 juin 1925 : même état, même dose.
En tout : 6 gr. 75 de stovarsol sodique dans la veine.
8 juin 1925 : le malade quitte l'hôpital ; rate n° 1, pas de lésions rénales.

FIÈVRE QUARTE

Gr. V..., quatorze ans. Récidive. Accès journaliers, rate douloureuse n° 3, forte anémie, présence de schizontes et de gamétocytes.

Traitement : 26 février 1925 : 1 gramme de stovarsol par voie buccale.
27 février 1925 : présence de parasites, 1 gramme de stovarsol par voie buccale.
28 février 1925 : présence de parasites, 1 gramme de stovarsol par voie buccale.
1er mars 1925 : présence de parasites.
1er mars 1925 : sulfate de quinine (1 gramme par jour) ; pendant la quinisation, les schizontes disparaissent.
13 mars 1925 : présence de gamétocytes, 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
14 mars 1925 : présence de gamétocytes ; 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
15 mars 1925 : absence de parasites, 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.
16 mars 1925 : forte congestion rénale.
17-19 mars 1925 : repos.

20 mars 1925 : le malade quitte l'hôpital ; rate n° 2, état rénal amélioré.

Au total : 4 gr. 75 de stovarsol.

TROPICA

L. B..., trente ans. Récidive. Fièvre sous-continuelle, rate douloureuse n° 4, foie douloureux, présence de trophozoïtes et de gamétocytes.

Traitement : 1er-5 janvier 1925 : le malade reçoit : 15 centigr. de néosalvarsan ; 3 grammes de sulfate de quinine et deux injections de cacodylate de soude à 10 centigr.

6 janvier 1925 : présence de gamétocytes, 30 centigr. de néosalvarsan.

7 janvier 1925 : présence de gamétocytes, 50 centigr. de cacodylate de soude dans la veine.

8 janvier 1925 : présence de gamétocytes : 1 gr. 25 centigr. de stovarsol par voie buccale.

9-16 janvier 1925 : présence de gamétocytes ; tous les jours, le malade reçoit 1 gr. 25 centigr. de stovarsol par voie buccale.

18 janvier 1925 : le malade quitte l'hôpital porteur de croissants, rate n° 2, état général très amélioré ; pas de congestion rénale.

Au total : 10 gr. de stovarsol.

T. T..., ... ans. Infection primaire. Accès journaliers ; rate n° 1, sous-ictère conjonctival, présence de trophozoïtes et de gamétocytes.

Traitement : 22 octobre 1925 : 25 centigr. de stovarsol.

23 octobre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol.

24 octobre 1925 : même état, même dose.

25 octobre 1925 : même état, même dose.

26 octobre 1925 : même état, même dose.

27 octobre 1925 : même état, même dose.

Au total : 4 grammes de stovarsol sodique dans la veine.

28 octobre 1925 : le malade quitte l'hôpital ; *aucune action sur les trophozoïtes et les gamétocytes ;* pas de congestion rénale, rate n°... ;

N. D..., quatorze ans. Récidive. Accès journaliers, rate n° 2, présence de trophozoïtes et de gamétocytes.

Traitement : 30 octobre 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

31 octobre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

1er novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol dans la veine.

Au total : 1 gr. 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

2 novembre 1925 : *le malade quitte l'hôpital porteur de trophozoïtes et de gamétocytes ;* pas de lésion rénales.

Sp. Gh..., ... ans. Récidive. Accès journaliers, rate n° 3, présence de trophozoïtes et de gamétocytes.

Traitement : 31 octobre 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

1er novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol.

2 novembre 1925 : présence de parasites. *Le malade quitte l'hôpital porteur de trophozoïtes et de gamétocytes ;* rate n° 2 ; pas de congestion rénale.

Au total : 1 gramme de stovarsol sodique.

3 novembre 1925 : le malade commence à être quininisé.

Scr. N..., treize ans. Récidive. Accès journaliers, rate n° 4, présence de trophozoïtes et de gamétocytes.

Traitement : 2 novembre 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

3 novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

4 novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigrammes de stovarsol sodique dans la veine.

Au total : 1 gr. 75 centigr. de stovarsol dans la veine.

5 novembre 1925 : *présence de trophozoïtes et de gamétocytes.*

6 novembre 1925 : le malade commence à être quininisé.

L. D..., trente-cinq ans. Récidive. Accès journaliers, rate n° 1, présence de trophozoïtes et de gamétocytes.

Traitement : 1er novembre 1925 : 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

2 novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol dans la veine.

3 novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol dans la veine.

4 novembre 1925 : présence de parasites, 75 centigr. de stovarsol dans la veine.

Au total : 2 gr. 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

Aucune action sur les trophozoïtes et les gamétocytes ; pas de congestion rénale.

INFECTIONS MIXTES

A. C..., quinze ans. Quarte et tropique, récidive, accès journaliers, rate n° 4, forte anémie, sous-ictère conjonctival, *présence de schizontes et gamétocytes de quarte et de gamétocytes de tropica.*

Traitement. — 29 mars 1925 : 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

30 mars 1925 : gamétocytes de quarte et de tropica, 1 gr. 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

30 mars 1925 : gamétocytes de quarte et de tropica, 1 gramme de stovarsol sodique dans la veine.

1er avril 1925 : gamétocytes de quarte et tropica, congestion rénale. Repos.

2 avril 1925 : même état.

3 avril 1925 : schizontes de quarte, gamétocytes de tropica, 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine ; rate n° 3.

4 avril 1925 : gamétocytes de quarte et tropica, 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

5 avril 1925 : même état, 1 gr. 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

6 avril 1925 : gamétocytes de quarte et tropica, 1 gr. 50 centigr. de stovarsol.

7 avril 1925 : absence de parasites, 1 gr. de stovarsol.

Au total : 8 gr. 25 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

8 avril 1925 : présence de croissants.

9 avril 1925 : même état.

10 avril 1925 : absence de parasites.

11 avril 1925 : même état.

12 avril 1925 : présence de croissants.

13 avril 1925 : présence de croissants, 1 gramme de quinine.

14 avril 1925 : absence de parasites.

15 avril 1925 : le malade quitte l'hôpital débarrassé de sa fièvre quarte ; rate n° 1 ; plus de congestion rénale, état général très amélioré.

M. A..., treize ans. Quarte et tropica, récidive, accès journaliers, rate n° 4, présence de schizontes et gamétocytes de quarte et de gamétocytes de tropica.

Traitement. — 4-12 avril 1925 : on donne au malade journellement 1 gramme de stovarsol à voie buccale.

Aucune action sur les parasites.

13 mars 1925 : présence de schizontes et gamétocytes de quarte et de gamétocytes de tropica ; 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

14 avril 1925 : gamétocytes de quarte et de tropica, 75 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

15 avril 1925 : même parasitisme, 1 gr. de stovarsol dans la veine.

16 avril 1925 : présence de schizontes et gamétocytes de quarte et de gamétocytes de tropica, 1 gr. 50 centigr. de stovarsol dans la veine.

17 avril 1925 : gamétocytes de quarte et de tropica, 1 gr. 50 centigr. de stovarsol sodique dans la veine.

Au total : 14 gr. 25 centigr. de stovarsol.

Le malade quitte l'hôpital porteur de gamétocytes de quarte et de tropica ; rate n° 1, état général très amélioré, aucune trace de lésions rénales.

Il résulte de nos recherches que les trois types de parasites se comportent différemment vis-à-vis du stovarsol ; ce fait a été d'ailleurs prouvé par Marchoux.

Les formes schizogoniques, ainsi que les gamétocytes de plasmodium vivax disparaissent du même sang après une dose minime de 50 centigrammes de stovarsol sodique dans la veine.

Les malades qui ont reçu des petites doses ont présenté d'habi-

tude des rechutes dans les premiers dix jours qui ont suivi le traitement.

Dans les conditions de nos expériences, nous n'avons pu constater de différence de sensibilité vis-à-vis du médicament entre les formes pigmentées et les formes tout à fait jeunes.

Sur vingt cas de tierce bénigne, neuf ont présenté des phénomènes de néphrite médicamenteuse aiguë (albuminerie, hématies, cylindrurie, etc.). Le déclanchement des phénomènes de congestion rénale n'était pas toujours en fonction de la quantité de substance. Ce fait nous détermine à croire que cette congestion est due à un état de débilité rénale causée par d'autres infections antérieures et aggravée par l'administration de cette substance congestive.

A remarquer que les symptômes d'irritation rénale cessaient après la suspension du stovarsol.

Les troubles rénaux ne réapparaissent plus après l'administration de la quinine, qui remplaçait le traitement par le stovarsol.

Dans tous les cas traités, nous n'avons jamais obtenu une réduction complète de la rate à la fin du traitement par le stovarsol.

Dans un cas de quarte, le stovarsol par voie buccale s'est montré complètement inactif ; les parasites ont disparu après la première dose endoveineuse de stovarsol sodique.

Dans les cas de tropica, nous n'avons pas obtenu d'effet thérapeutique avec 3 gr. 75 centigr. de stovarsol ; les trophozoïtes étaient tout aussi résistants que les formes sexuées.

Dans un cas d'infection mixte (quarte et tropica), nous n'avons pas obtenu la disparition des gamétocytes. Le malade, qui avait reçu en tout 16 grammes de stovarsol, continuait à avoir des gamétocytes dans la circulation.

D'après nos recherches, le stovarsol ne peut pas remplacer la quinine dans le traitement de la malaria. Il pourrait constituer un bon adjuvant de la quininisation sans présenter les inconvénients du néosalvarsan. Il est nécessaire de surveiller journellement l'état du rein des malariques traités au stovarsol et de faire cesser le traitement dès qu'on a constaté le moindre symptôme d'irritation rénale. Dans ces cas, on peut tout de suite commencer la quininisation du malade.

RECHERCHES SUR LA RÉSISTANCE DES TOXINES DIPHTÉRIQUE ET DYSENTÉRIQUE AUX DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN IONS HYDROGÈNES

par

C. IONESCO-MIHAIESTI et A. DAMBOVICEANU

(Travail du Laboratoire de médecine expérimentale et de l'Institut de Sérothérapie de Bucarest)

Depuis les recherches classiques de Roux et Jersin sur la toxine diphtérique, de nombreux travaux expérimentaux sur les différentes toxines microbiennes ont été publiés dans la littérature bactériologique. On est pourtant encore bien loin d'être fixé sur leur constitution ou sur le mécanisme de leur élaboration et de leur action toxique. Dans les dernières années, les importantes études de Walbum, Dernby, Walbum et Dernby, Abt et Loiseau, etc., etc., sur les toxines diphtérique, tétanique, staphylococcique ou autres, ont apporté des contributions excessivement intéressantes aux conditions d'élaboration *in vitro* de ces différentes toxines. Walbum, dans un travail récent, a présenté des expériences très suggestives concernant la constitution de la toxine diphtérique, et il a émis des hypothèses très séduisantes à ce sujet. Nous poursuivons, déjà depuis quelque temps, des études sur les toxines bactériennes. Ce travail représente une partie de nos recherches relatives à l'influence de la réaction du milieu sur les propriétés toxiques des toxines.

L'action destructrice des différents acides sur certaines toxines a été mentionnée depuis les premières recherches sur les toxines. Roux et Jersin, dans leur second mémoire sur la toxine diphtérique, avait attiré l'attention sur la faible toxicité des bouillons diphtériques acides et sur l'influence destructrice des acides lactique et tartrique sur cette toxine. Ce fait a été depuis confirmé par de nombreux chercheurs. Behring, J. Ritchie, Doerr, etc., et

plus récemment Ramon, de Potter, ont étudié et noté l'action nocive des acides minéraux et organiques sur différentes toxines microbiennes. L'objet de nos recherches a été de préciser les limites de concentration en ions H entre lesquelles la toxine diphtérique et la toxine dysentérique gardent encore leurs propriétés toxiques après l'inoculation chez les animaux (1).

Méthode

Nous avons employé, dans nos recherches, des toxines en bouillon, stabilisées et gardées depuis quelques mois à la glacière sous couche de toluol. Ces toxines avaient été préparées de la manière habituelle : infusion de viande (sans macération préalable) avec 15/1000 centimètres cubes peptone Fairchild. La réaction finale, après filtration et stabilisation, est comprise entre pH = 7,9 et pH = 8,1. Leur toxicité avait été soigneusement établie par des titrations répétées à différents intervalles.

Nous avons adopté, pour l'obtention du pH désiré, le procédé de la dilution des toxines dans des solutions de corps-tampons. Ces solutions, préparées avec toutes les précautions d'asepsie nécessaires, étaient des mélanges d'acétate de sodium et d'acide acétique, de glycocole et d'acide chlorhydrique, de citrate de sodium et d'acide chlorhydrique, pour la zone acide ; de phosphates mono, bi et trisodiques, de glycocole et de soude, pour la zone alcaline.

Les concentrations des différentes substances employées ne dépassaient jamais: pour l'acétate m/100, les phosphates m/30, le glycocole m/30, le citrate m/20, l'acide acétique m/4, l'acide chlorhydrique m/20, la soude m/10.

Nous avons obtenu de cette manière une échelle de pH allant de pH = 2 à pH = 13,5. Les dilutions de toxine sont faites dans ces différentes solutions à pH préalablement déterminé; le changement du pH est contrôlé une demi-heure après l'adjonction de la toxine et vingt-quatre heures après.

Pour la détermination du pH, nous avons employé les deux procédés colorimétrique et électrométrique. Le procédé colorimétrique, avec les indicateurs monochromes de L. Michaelis, est insuffisant, surtout pour la zone alcaline.

(1) Dans un travail paru, pendant la rédaction de notre Note, dans le volume 138 de la *Bioch. Zeitsch.*, Gröer étudie spécialement l'influence des différents pH sur l'action toxique de la toxine diphtérique. Ses résultats concordent seulement partiellement avec les nôtres.

I. — Expériences avec la toxine diphtérique

Toxine diphtérique stabilisée, pH = 7,9, dose-limite mortelle 0.006, L_o = 0,22, L_t = 0,31 centimètres cubes.

Toutes les dilutions de toxine contiennent sur un volume uniforme de 12 centimètres cubes, 0,66 centimètres cubes de toxine pure, ce qui représente L_o sur 4 centimètres cubes de dilution.

Les dilutions à différents pH sont inoculées sous la peau de cobayes à raison de 4 centimètres cubes de chaque dilution pour un animal. Les inoculations sont faites trente minutes après la préparation de la dilution et vingt-quatre heures après.

1. — Dilutions inoculées trente minutes après la préparation.

Solutions	Nr. et poids des animaux	pH de la solution de tampons	pH 30 minutes apres l'addition de toxine	Résultats
	Cob. 86-310 gr.	3.5	3.5	*survit* ; escarre, œdème local.
CH_3COONa	— 57-315 gr.	4.0	4.0	*survit* ; léger œdème.
+	— 27-360 gr.	4.2	4.3	*survit* ; léger œdème.
CH_3COOH	— 79-375 gr.	4.7	4.9	+ *40 heures.*
	— 58-310 gr.	5.2	5.4	+ *34 heures.*
	— 97-315 gr.	5.9	6.7	+ *20 heures.*
PO_4HNa_2	— 3-300 gr.	6.4	7.5	+ *20 heures.*
	— 78-305 gr.	9.39	8.91	+ *19 heures.*
+ NaOH	— 85-320 gr.	10.01	9.6	+ *30 heures.*
	— 56-315 gr.	5.9	6.1	+ *24 heures.*

Deux cobayes témoins, inoculés sous la peau chacun avec 6 centimètres cubes des solutions extrêmes (des corps tampons) acide et alcaline (pH : 3.5 et pH : 10.01), présentent des lésions locales consistant en un œdème assez prononcé qui disparaît sans laisser de traces trente-six heures après chez l'animal ayant reçu la solution alcaline. Chez l'autre (solution acide), il se forme une escarre qui guérit après sept ou huit jours.

Tous les animaux ayant succombé présentaient les lésions typiques de l'intoxication diphtérique : congestion intense des capsules surrénales, liquide dans les plèvres et le péricarde, etc.

2. — Dilutions inoculées vingt-quatre heures après la préparation

Solutions	Nr. et poids des animaux	pH de la solution de tampons	pH 24 heures après l'addition de toxine	Résultats
Acétate de Na + Acide acétique	Cob. 12-250 gr.	4.5	4.7	*survit* ; léger œdème local.
	— 13-300 gr.	5.0	5.35	*survit* ; léger œdème local.
	— 18-260 gr.	5.7	5.9	+ *48 heures.*
Phosphate mono- + Phosphate disodique	— 31-300 gr.	5.7	5.95	+ *36 heures.*
	— 19-350 gr.	6.6	6.75	+ *36 heures.*
Phosphate di- + Phosphate tri-sodique	— 75-360 gr.	9.0	8.1	+ *36 heures.*
	— 11-310 gr.	10.3	9.4	*survit.*
	— 26-320 gr.	10.7	9.8	*survit.*
	— 21-250 gr.	11.0	10.4	*survit.*
	— 93-260 gr.	11.7	11.1	*survit.*

Les animaux ayant succombé présentaient les lésions typiques. Tous les autres ont été suivis pendant au moins trois semaines : ils n'ont rien présenté dans la suite.

Conclusions. — La destruction de la toxine diphtérique par les différentes concentrations en ions H ou OH n'est pas immédiate. Si les dilutions de toxine sont inoculées trente minutes après leur préparation, la zone de concentration en ions H, où la toxicité est encore presque inaltérée, est comprise entre le pH : 4,7-4,9 du côté acide, et le pH : 9,6-10,01 du côté alcalin.

Cette zone est moins étendue si la toxine a subi l'influence des différents pH un temps plus prolongé (vingt-quatre heures dans nos expériences). Les limites extrêmes, dans ces derniers cas, sont : 5, 7-5,9 pour la zone acide, pH 9-9,4 pour la zone alcaline.

II. — Expériences avec la toxine dysentérique.

La toxine employée dans ces recherches est une toxine stabilisée, gardée à la glacière sous couche de toluène depuis plusieurs mois. Son pH est égal à 8,1-8,15. Dose mortelle pour le lapin (1200-1500 gr.) par voie intraveineuse = *0.01 centimètre cube.* Toutes les dilutions contiennent, sous un volume uniforme de 20 centimètres cubes, 2 cc. 3 de toxine pure. Chaque animal (lapin dans ces expériences) reçoit 2 centimètres cubes de la dilution à essayer, ce qui représente vingt-trois doses mortelles.

Nous nous sommes d'abord servis, dans ces expériences des mêmes tampons que pour la toxine diphtérique. Après nos premiers résultats, nous nous sommes rendu compte que l'échelle des pH établie avec eux était insuffisante pour cette toxine. Nous avons dû ajouter pour ces expériences deux nouveaux couples : le glycocolle avec de l'acide chlorhydrique ou de la soude, et le citrate de soude avec l'acide chlorhydrique.

Quelques expériences préliminaires nous ont assurés que ni le glycocolle ni le citrate à un pH voisin de la neutralité, et dans les mêmes concentrations que dans les solutions définitives, n'exerçaient comme tels, aucune action nocive sur la toxine dysentérique. De même, leurs solutions inoculées dans les veines des lapins, aux mêmes doses que dans les expériences avec la toxine, ne déterminent pas d'accidents toxiques.

Voici maintenant les résultats de nos expériences. Dans les tableaux qui suivent, nous avons concentré les résultats de plusieurs expériences successives.

1. — Dilutions inoculées trente minutes après la préparation.

Solutions	Nr. et poids des animaux	pH de la solution de tampons	pH 30 minutes après l'addition de toxine	Résultats
Glycocolle + HCl	Lap. 1170-1082 gr.	2.07	2.15	+ *3 jours.*
	— 1067-1100 gr.	3.09	3.4	+ *24 heures.*
	— 1091-1050 gr.	3.52	4.5	+ *18 heures.*
CH_3COONa + CH_3COOH	— 1077- 980 gr.	4.5	4.5	+ *48 heures.*
	— 1078-1200 gr.	4.6	4.95	+ *20 heures.*
	— 1019-1150 gr.	5.1	6.7	+ *36 heures.*
	— 1090-1120 gr.	5.8	7.1	+ *36 heures.*
PO_4H_2Na + PO_4HNa_2	— 1047-1160 gr.	5.9	6.5	+ *18 heures.*
	— 1043-1020 gr.	6.4	6.9	+ *22 heures.*
	— 1012-1050 gr.	7.0	7.1	+ *18 heures.*
	— 1028-1050 gr.	7.4	7.4	+ *20 heures.*
PO_4HNa_2 + PO_4Na_3	— 1076-1090 gr.	9.9	8.1	+ *18 heures.*
	— 1052- 980 gr.	10.3	8.3	+ *5 jours*, paral. 24 h.
	— 1036-1050 gr.	10.6	8.5	+ *36 heures.*
	— 1040-1170 gr.	11.0	9.0	+ *24 heures.*
	— 1033-1060 gr.	11.5	10.9	+ *48 heures.*
Glycocolle + NaOH	— 1070-1120 gr.	10.0	9.2	+ *18 heures.*
	— 1038-1290 gr.	10.5	9.4	+ *12 heures.* Femelle pleine.
	— 1024-1140 gr.	12.3	10.4	+ *24 heures.*
	— 1100-1080 gr.	13.5	10.9	+ *24 heures.*

Tous les animaux présentent à l'autopsie les lésions caractéristiques : intense congestion du gros intestin, accompagnée d'œdème et de foyers hémorragiques sous la muqueuse (chez les animaux ayant résisté plus de trente-six heures). La plupart présentent aussi des foyers hémorragiques disséminés au niveau de la moelle dorsale ou cervicale.

2. — Dilutions inoculées

VINGT-QUATRE HEURES APRÈS LA PRÉPARATION

Solutions	Nr. et poids des animaux	pH de la solution de tampons	pH 24 heures apres l'addition de toxine	Résultats
Glycocolle + HCl	Lap. 1138-1100 gr.	2.07	2.4	*survie*, aucun symptôme.
	— 1110- 980 gr.	3.09	4.2	+ *24 heures.*
	— 1122- 950 gr.	3.52	6.1	+ *30 heures.*
Citrate de sodium + HCl	— 1144-1200 gr.	2.0	3.0	*survie*, aucun symptôme.
	— 1114-1250 gr.	2.5	3.2	*survie*, aucun symptôme.
	— 1060-1030 gr.	3.1	3.49	+ *5 jours et demi* paral. 48 h.
	— 1193-1150 gr.	3.5	3.8	+ *3 jours et demi* paral. 48 h.
	— 1106-1170 gr.	3.7	3.9	+ *2 jours*, paral. 28 h.
	— 1111-1120 gr.	3.9	4.1	+ *36 heures.*
Acétate de sodium + Acide Acétique	— 1187-1070 gr.	4.5	4.7	+ *48 heures.*
	— 1023-1260 gr.	4.6	4.95	+ *24 heures.*
	— 410-1150 gr.	5.1	6.9	+ *24 heures.*
	— 1017-1120 gr.	5.8	7.5	+ *22 heures.*
PO4H2Na + PO4HNa2	— 1075-1020 gr.	5.9	6.5	+ *22 heures.*
	— 1096- 980 gr.	6.4	7.0	+ *36 heures.*
	— 407-1150 gr.	7.0	7.25	+ *24 heures.*
PO4HNa2 + PO4Na3	— 202- 970 gr.	7.4	7.45	+ *36 heures.*
	— 1050-1120 gr.	9.9	8.1	+ *36 heures.*
	— 1029-1050 gr.	10.3	8.3	+ *24 heures.*
	— 1081-1170 gr.	10.6	8.4	+ *40 heures.*
	— 1027-1100 gr.	11.0	8.7	+ *24 heures.*
	— 1026- 980 gr.	11.5	10.2	+ *3 jours.*
	— 1159- 970 gr.	11.7	11.1	+ *3 jours*, paral. 36 h.
Glycocolle + NaCH	— 1189-1080 gr.	10.0	8.7	+ *24 heures.*
	— 1167-1020 gr.	10.5	8.8	+ *24 heures.*
	— 1117- 980 gr.	12.3	9.97	+ *36 heures.*
	— 1147-1050 gr.	13.5	10.5	+ *4 jours et demi.*

Conclusions. — De même que pour la toxine diphtérique, les différentes concentrations en ions H ou OH n'agissent sur la toxine dysentérique qu'après un certain temps : trente minutes

de contact est un intervalle tout à fait insuffisant pour que des pH, allant de 2,07-2,15 dans la zone acide jusqu'à 11 dans la zone alcaline, influencent d'une manière appréciable l'action toxique de cette toxine. Il semble pourtant que, dans la zone acide à l'extrême limite 2,07-2,15 réalisée dans cette expérience, l'action toxique a subi une certaine atténuation, même après trente minutes. Cette large zone de tolérance se rétrécit après vingt-quatre heures dans certaines proportions, le pH 2,5-3,0 anihile complètement l'action toxique ; entre pH 3,0-3,5, il y a une certaine atténuation de la toxine qui se manifeste seulement par une période un peu plus longue d'incubation. Nous ne sommes pas arrivés, avec notre dispositif expérimental, à trouver la limite, du côté alcalin, où l'action toxique de cette toxine serait détruite.

Comme on peut se rendre compte d'après ces recherches, il y a une grande différence dans la manière dont ces deux toxines se comportent par rapport aux réactions du milieu. La toxine diphtérique est de beaucoup la plus fragile, sa zone de tolérance étant considérablement plus réduite. L'énorme tolérance de la toxine dysentérique indiquerait, nous semble-t-il, une différence essentielle dans sa composition en comparaison avec la toxine diphtérique.

BIBLIOGRAPHIE

Roux et Jersin : *Annales de l'Inst. Pasteur,* t. 3, pp. 273, 1889.
J. Ritchie : *The Journal of Hygiene,* 1901, p. 125.
Walbum (L.-E.) : *Biochemische Zeitschrift,* Bd. 130, pp. 24 et suiv.
K.-G. Dernby : *Biochemische Zeitschrift,* Bd. 81, 1917; Bd. 126, 1912 ; Bd. 133, 1922.
Dernby et Davide : *Journal Path. a. Bact.,* vol. 24, 150, 1921.
G. Ramon : *Comptes Rendus Acad. Sc.,* Paris, 22 janv. 1923, 5, 176, p. 267.
De Potter : *Bull. de l'Acad. royale de Belgique,* v. III, n° 6, 1923.
Abt et Loiseau : *Ann. de l'Inst. Past.,* 1922.
Dernby et Walbum : *Biochem. Zeitschr.,* Bd. 138, p. 305, 1923.
Fr.-V. Groer : *Biochem. Zeitschr.,* Bd. 138, p. 13, 1923.

(Travail reçu à la Rédaction le 15 juillet 1924.)

SUR L'INFLUENCE DU SYSTÈME NERVEUX ET DES GLANDES ENDOCRINES SUR LA TENEUR EN EAU DES ORGANES ET TISSUS

par

C.-I. PARHON, V. MARZA et M. CAHANE
(de Jassy)

(Travail du Laboratoire de la clinique des maladies nerveuses et mentales de Jassy)

Les études faites dans les derniers temps sur la vieillesse et le rajeunissement ont soulevé de nombreux problèmes des plus intéressants au point de vue biologique.

Nous citerons ainsi celui de la différenciation et de la dédifférenciation, de la reversibilité des phénomènes biologiques, du rôle des glandes endocrines dans l'évolution et l'involution de l'organisme, de l'influence curative que certains traitements organothérapiques peuvent avoir sur les phénomènes de la vieillesse, etc.

La solution de toutes ces questions demande, à notre avis, des recherches expérimentales approfondies.

Dans des travaux antérieurs (1) concernant le problème de la vieillesse ou celui de la biologie des âges, nous avons exposé nos connaissances actuelles sur ce sujet et nous avons montré, entre autres questions, qu'une des meilleures caractéristiques du vieillissement, c'est la déshydratation de l'organisme.

Lorsqu'on voudra étudier l'action d'un traitement au point de vue du rajeunissement ou bien celle de telle ou telle condition

(1) C.-I. Parhon et M. Kahane : « Sur les effets des greffes testiculaires chez les vieux organismes » (*Revue française d'Endocrinologie*, t. II, n° 1, 1924) ; — C.-I. Parhon : « La Ilikibiologia. Sus problemas, sus metodes, sus relaciones con la endocrinologia » (*Revista Medica*, Barcelona, enero 1925) ; — Bătrănetea, édit., Viata Românească, Jassy, 1924.

au point de vue du vieillissement, on devra tenir compte de la teneur en eau des organes et des tissus.

Cette considération fut le point de départ de nos recherches.

Jacques Loeb (1) avait soutenu que les phénomènes de la vie sont reversibles. D'autres auteurs, tels que Marinesco (2), partagent plutôt l'avis contraire.

Nos propres recherches (3) nous conduisent à penser qu'une certaine reversibilité évolutive peut être observée dans certaines circonstances, même pour des tissus très différenciés, tels que le tissu nerveux ou musculaire.

En ce qui concerne ce dernier, Durante (4) avait soutenu depuis longtemps que certaines altérations musculaires aboutissent à une transformation de la fibre musculaire adulte en des cellules musculaires élémentaires.

D'autre part, après la section des nerfs moteurs, on observe une multiplication importante des noyaux des fibres musculaires en même temps que des modifications du myoplasme.

On peut penser que ces phénomènes représentent un processus dédifférentiel, sans vouloir prendre le mot dans son sens absolu, et que, en même temps, le tissu musculaire, dont les conditions d'existence sont profondément changées par l'absence de l'influx nerveux, se trouve rajeuni. La multiplication des noyaux semble parler dans ce sens.

Mais, s'il en est ainsi, sa teneur en eau doit augmenter. Il doit en être de même pour le bout central des nerfs sectionnés, bout dont le retour à un état évolutif moins avancé semble mis en évidence par le fait qu'il commence à pousser de nouvelles fibres nerveuses.

Nous avons donc étudié la teneur en eau des muscles privés de leur innervation, celle du bout central des nerfs sectionnés, ainsi que celle des muscles et des nerfs du côté normal, et qui ont fait fonction de témoins.

Le tableau ci-joint rend compte de l'ensemble de nos constatations. *(Voir Tableau I.)*

(1) Jacques Loeb : *La Dynamique des phénomènes de la Vie,* Paris, 1908.

(2) G. Marinesco : « Etudes histologiques sur le mécanisme de la sénilité » (*Revue générale des Sciences,* n° 24, 1924) ; — « L'opération de Steinach peut-elle réaliser le rajeunissement de l'organisme animal ? » (*Presse Médicale,* pp. 309-311, 1922) ; — *Problema batrânetei si a mortei naturale. Probleme si idei,* Bucarest, 1924.

(3) C. Bacaloglu et C.-I. Parhon : « Polynucléose neurocytaire et amytotique de la cellule nerveuse » (*C. R. Soc. Biol.,* XCIV, p. 714, 1926).

(4) Durante : « Atrophies musculaires » (*Traité d'Histologie pathologique* de Cornil et Ranvier, t. II).

TABLEAU I

Numéros	INTERVENTION	NERF SCIATIQUE			BICEPS CRURAL			DEMI-TENDINEUX			JAMBIER ANTÉRIEUR			JUMEAUX		
		Côté normal	Côté opéré	Différence	Côté normal	Côté opéré	Différence	Côté normal	Côté opéré	Différence	Côté normal	Côté opéré	Différence	Côté normal	Côté opéré	Différence
1	Chat : 15 jours après la section du sciatique.....	69.07	74.10	+ 5.03	—	—	—	77.05	79.53	+ 2.48	—	—	—	77.60	80.02	+ 2.42
2	Chien : 19 jours après la même opération	60.38	63.57	+ 3.19	71.60	72.99	+ 1.39	71.93	73.54	+ 1.61	—	—	—	73.23	73.50	+ 0.27
3	Lapin : 19 jours après la rupture du sciatique.....	—	—	—	79.88	79.92	+ 0.04	79.51	81.73	+ 2.22	79.96	81.44	+ 1.48	79.55	84.90	+ 5.35
4	Cobaye : 26 jours après la section du sciatique.....	72.89	77.56	+ 4.67	76.26	78.41	+ 2.15	77.37	78.00	+ 0.63	76.00	79.00	+ 3.00	77.19	80.23	+ 3.04
5	Lapin : 30 jours après la rupture du nerf sciatique.....	—	—	—	79.58	79.59	+ 0.01	79.85	80.17	+ 0.32	79.51	82.88	+ 3.37	79.43	81.60	+ 2.17
6	Cobaye : 31 jours après la section du même nerf.....	72.22	76.06	+ 3.84	76.16	82.03	+ 5.87	77.89	80.92	+ 3.03	77.89	82.18	+ 4.29	77.69	81.86	+ 4.17
7	Lapin : 65 jours après la rupture de ce nerf.....	69.34	78.72	+ 9.38	76.85	76.50	— 0.35	77.63	78.06	+ 0.43	77.18	79.84	+ 2.66	76.83	76.03	— 0.80
8	Lapin : 90 jours après la rupture du sciatique.....	69.92	74.86	+ 4.94	78.28	79.67	+ 1.39	76.03	79 16	+ 3.13	—	—	—	76.34	76.15	— 0.19
9	Chien ; 30 jours après la section du nerf	63.20	73.20	+ 10.00	76.70	76.65	— 0.05	75.93	76.91	+ 0.98	—	—	—	76.89	79.25	+ 2.36
10	Chat : 20 jours après la rupture de ce nerf.....	72.84	73.30	+ 0.46	79.31	79.83	+ 0.52	79.28	79.90	+ 0.62	79.04	78.29	— 0.75	79.70	79.71	+ 0.01
11	Lapin : 70 jours après cette même opération	72.21	75.42	+ 3.21	—	—	—	76.20	76.87	+ 0.67	78.74	79.04	+ 0.30	76.73	79.21	+ 2.48

Il en résulte que, d'une façon générale, le bout central du nerf, comme les muscles, après rupture ou section de leurs fibres motrices, sont plus riches en eau que les tissus normaux respectifs, ce qui semble pouvoir être interprété comme un phénomène de rajeunissement.

Certains faits qui s'écartent de ces constatations générales doivent être expliqués. En ce qui concerne, par exemple, quelques écarts que nous avons trouvés pour le biceps, et dans lesquels le muscle normal s'est montré plus riche en eau que le muscle énervé (lapin soixante-cinq jours après la rupture du sciatique ; chien, trente jours après la section de ce même nerf), on doit supposer qu'un certain nombre au moins des fibres qui se détachent assez haut du nerf sciatique ont pu être respectées pendant l'opération.

Chez le chat avec rupture du sciatique, sacrifié vingt jours après l'intervention, une affection intestinale avec diarrhée est intervenue et a pu peut-être modifier les résultats.

Quoi qu'il en soit, l'enrichissement en eau du bout central des nerfs et des muscles énervés nous semble un fait établi (1).

Il faudra tâcher de préciser dans l'avenir si cette hydratation concerne les interstices cellulaires ou si elle est intracellulaire et liée dans cette dernière éventualité, aux micelles colloïdales, ou si elle occupe seulement leurs interstices.

En attendant, il nous semble extrêmement probable que c'est la fibre nerveuse ou musculaire elle-même qui devient plus riche en eau.

Il semble, d'autre part, exister un rapport étroit entre l'hydratation des tissus et leur richesse en certains éléments, tels que le *calcium*. Banu (2) insista sur ce fait en ce qui concerne le cerveau.

L'un de nous établit avec Marie Parhon (3) qu'il existe un rapport inverse entre l'âge d'un animal et la teneur en eau et en calcium de ses muscles.

Dans cet état de la question, il nous a semblé intéressant de connaître la teneur en calcium des muscles énervés. Nous avons donc étudié cette question et nous avons dosé en même temps aussi le magnésium.

(1) Un résumé de ces recherches fut publié dans les *C. R. de la Soc. de Biologie*, t. XCIV, pp. 711-1926.

(2) Banu, Thèse de Paris.

(3) C.-I. Parhon et Marie Parhon : « Sur le rôle du calcium dans la biologie des âges » (*C. R. de la Soc. de Biologie*, numéro jubilaire, mai 1923).

Voici le résultat de nos recherches :

Chez un lapin âgé de cinq mois et dont le nerf sciatique est rompu depuis quatre mois, les muscles du côté opéré contenaient 0.215 milligrammes de calcium, tandis que la quantité trouvée fut de 0.195 dans les muscles du côté normal.

Chez deux autres lapins dont l'âge était de neuf mois et de neuf mois et dix jours, et dont le même nerf avait été rompu depuis quatre mois chez le premier, depuis cent trente jours chez le second, la quantité du calcium fut respectivement de 0.128 et 0.114 milligrammes dans les muscles du côté opéré et de 0.080 et 0.094 du côté normal.

Chez un cobaye âgé de cent cinq jours, et dont le sciatique avait été sectionné depuis deux mois, le calcium des muscles du côté opéré fut de 0.231 milligrammes pour 0.196 du côté normal.

Enfin, chez un chien d'environ deux ans, dont le sciatique fut réséqué sur une longueur d'à peu près 3 centimètres et dont l'examen chimique des muscles fut pratiqué après seize jours, on trouva 0.124 milligrammes de calcium du côté opéré et 0.121 milligrammes du côté normal.

Le magnésium fut respectivement de 0.287, 0.160, 0.192, 0.160 et 0.160 milligrammes dans les muscles du côté opéré, et de 0.217, 0.095, 0.140, 0.145, 0.171 milligrammes du côté normal.

Il ressort de ces recherches *que les muscles sont plus riches en calcium du côté énervé que du côté normal.*

Il en fut de même du magnésium. Ce ne fut que chez l'animal dont le nerf n'était sectionné que depuis seize jours qu'on a observé une exception à cette règle.

Nous avons déjà vu que les muscles du côté énervé sont plus riches en eau.

L'augmentation de l'eau et du calcium rapproche les muscles énervés de ceux appartenant à des animaux moins âgés. Parallèlement aux modifications structurales qui semblent se faire dans le sens d'une dédifférenciation, il se produit donc au point de vue de leur composition chimique une sorte de rajeunissement des muscles énervés.

Cette augmentation parallèle de l'eau et du calcium à la suite d'une même intervention vient en outre à l'appui de cette fonction hydratante du calcium que l'un de nous, avec Marie Parhon, ont supposé dans un travail antérieur.

Il nous semble également intéressant de rapprocher l'augmentation du calcium et du magnésium trouvée par nous de la diminution du potassium constatée dans les muscles blancs

de lapins, après la section de leurs nerfs par Neuschlosz et R.-A. Trelles (1).

Dans une seconde série de recherches, nous avons entrepris l'étude des rapports des glandes endocrines avec l'hydratation des tissus (2). Le plan général de ces recherches est celui de connaître quelle action exerce l'ablation d'un organe glandulaire, ou bien le traitement par des extraits de ce même organe sur la teneur en eau des organes et tissus.

Nous commencerons par la glande thyroïde.

Marie Parhon (3) avait établi que les animaux privés de leur glande thyroïde ont leurs tissus plus riches en eau.

Il nous restait donc à étudier la richesse en eau des organes et tissus chez les animaux soumis à un traitement thyroïdien. Nos observations ont porté surtout sur les muscles, le foie, le pancréas, les reins. L'âge et le poids des animaux en expérience fut choisi autant que possible assez semblable chez les animaux traités et chez les témoins.

La dose employée fut de 0 gr. 25 de thyroïde par jour.

Le tableau II rend compte de l'ensemble de nos résultats.

En ne tenant compte que des différences qui dépassent 1 %, on constate ce qui suit :

En ce qui concerne les muscles, on ne constate pas des différences très importantes entre les témoins et les animaux, qui ont reçu pendant 10, 23, 31, 35 et 44 jours du corps thyroïde.

Par contre, chez ceux qui ont reçu pendant 28, 30, 50, 56, 62 et 76 jours le même traitement, on constate une diminution de l'eau musculaire variant entre 1 % et 2,47 %

Dans le foie, on remarque, par contre, d'une façon constante,

(1) Neuschlosz and Trelles : « Significance of potassium ions for the tonus of striated skeletal muscle. II. The mode of fixation and amount of potassium in striated muscle under normal and pathological condition » (*Arch. ges. Physiol.*, 204, 374-385, 1924, analysé dans les *Chemical Abstracts*, 18, 1924).

(2) Parhon, Marza et Kahane : *a)* « Sur la teneur en eau du tissu musculaire et de certains organes chez les animaux soumis au traitement thyroïdien » (*C. R. Soc. Biologie*, XCIV, p. 71, 1926) ; — *b)* « Sur la teneur en eau du tissu musculaire et de quelques organes chez les animaux traités par des injections d'extrait du lobe postérieur de l'hypophyse » (*C. R. Soc. Biologie*, t. XCIV, p. 889, 1926).

(3) Marie Parhon : « Sur la teneur en eau des tissus chez les moutons normaux et thyroïdectomisés » (*Bull. de l'Association des psychiatres roumains*, Soc. de Neurologie, Psychiatrie, Psychologie et Endocrinologie de Jassy, séance du 25 octobre 1921), 4e année, n° 1-2, 1922).

une augmentation de l'eau (1) variant entre 1,03 et 4,47. Ce dernier chiffre fut trouvé chez l'animal traité pendant 56 jours. Le chiffre minimum (1,03) fut trouvé chez l'animal traité pendant 35 jours.

Mais l'augmentation de l'eau n'alla pourtant pas toujours d'une façon parallèle à la durée du traitement, car, chez un animal hyperthyroïdisé pendant 74 jours, la différence procentuelle par rapport au témoin ne fut que de 1,15, et chez un autre traité seulement pendant dix jours, elle fut de 2,74.

Différences de même sens (six fois sur huit examens) et variant entre 2,29 et 4,41 en ce qui concerne la teneur en eau du pancréas. Ces différences furent observées chez des animaux traités pendant 23 à 74 jours. La différence minima fut observée chez l'animal traité pendant 30 jours, la maxima chez celui hyperthyroïdisé pendant 74 jours.

En ce qui concerne les reins, nous avons trouvé des différences cinq fois sur dix examens. Mais elles ne furent pas toujours du même sens. Deux fois, on constate une diminution (1,01 et 1,40), trois une augmentation de l'eau (1,60 et 3,03).

Pour le cerveau, nous n'avons trouvé des différences que trois fois sur douze examens, et ces différences ne furent pas de même sens (différence en moins de 1,17 dans un cas, différences en plus de 1,33 et 2,36 dans deux cas chez les animaux traités).

Pour la glande thyroïde, nous avons trouvé trois fois sur trois examens une augmentation de la teneur en eau (variant entre 1,33 et 1,42) chez les animaux qui recevaient de la glande thyroïde.

Il en fut de même pour le thymus (variations entre 1,22 et 4,20) cinq fois sur onze examens. Dans un sixième cas, l'eau était, par contre, diminuée (1,02 %) chez l'animal hyperthyroïdisé (pendant 44 jours). Quant aux testicules, nous n'avons trouvé des différences dépassant l'unité que trois fois sur dix examens. Ces différences furent d'ailleurs de même sens. Elles furent de 1,72, 2,54 et 3,49 % en moins.

Nous retiendrons donc de ces recherches la diminution de l'eau musculaire et l'augmentation de l'eau hépatique, pancréatique, thymique (dans la plupart des cas), thyroïdienne et même cérébrale.

De quelle façon peut-on expliquer cette action ? Les études de

(1) Si l'on tient compte aussi des différences au-dessous de l'unité, on doit noter que l'eau du cerveau augmente aussi dans la plupart des cas (neuf fois sur douze cas).

TABLEAU II

Numeros	COBAYE	Durée du traitement	Poids		Age de l'animal	Cerveau	Différence	Thyroïde	Différence	Thymus
			Initial gr.	Final gr.						
1	Hyperthyroïdisé.....	10 j.	222	207	100 jours	81.00	—	70.00		78.98
1′	Témoin.....	—	190	246	96 jours	80.39	+ 0.61	—	—	79.76
2	Hyperthyroïdisé.....	23 j.	—	—	7 m., 23 j.	81.50		—		79.18
2′	Témoin.....	—	—	—	7 m., 23 j.	81.40	+ 0.10	—	—	75.59
3	Hyperthyroïdisé.....	28 j.	318	201	5 mois	79.96		—		78.78
3′	Témoin.....	—	280	432	5 mois	79.89	+ 0.07		—	78.67
4	Hyperthyroïdisé.....	30 j.	278	227	4 mois	80.81		74.03		79.04
4′	Témoin.....	—	242	318	4 mois	79.58	+ 1.23	72.70	+ 1.33	78.91
5	Hyperthyroïdisé.....	31 j.	335	315	4 mois	78.60		72.18		76.86
5′	Témoin.....	—	335	397	4 mois	79.38	— 0.78	70.76	+ 1.42	75.20
6	Hyperthyroïdisé.....	35 j.	340	240	5 mois, 5 jours	79.95		75.42		79.00
6′	Témoin.....	—	320	452	5 mois, 5 jours	79.79	+ 0.16	—	—	79.05
7	Hyperthyroïdisé.....	44 j.	355	346	5 m., 14 j.	79.00		—		77.26
7′	Témoin.....	—	354	438	4 m., 28 j.	80.17	— 1.17	75.64	—	78.28
8	Hyperthyroïdisé.....	50 j.		250	80 jours	80.20		—		78.10
8′	Témoin.....	—		351	80 jours	80.66	— 0.46	—	—	76.88
9	Hyperthyroïdisé.....	56 j.	740	430	16 mois	77.89		74.22		—
9′	Témoin.....	—	—	760	16 mois	77.60	+ 0.29	—	—	—
10	Hyperthyroïdisé.....	62 j.	632	472	16 m., 16 j.	80.76		73.11		80.27
10′	Témoin.....	—	—	654	16 m., 16 j.	78.40	+ 2.36	71.70	+ 1.41	76.07
11	Hyperthyroïdisé.....	64 j.	638	424	13 m., 15 j.	79.59		72.07		76.78
11′	Témoin.....	—	—	636	13 m., 7 j.	79.27	+ 0.32	—	—	77.45
12	Hyperthyroïdisé.....	74 j.	642	434	15 mois	78.71		—		78.47
12′	Témoin.....	—	—	731	15 mois	78.83	— 0.12	—	—	75.38

Différence	Rein	Différence	Foie	Différence	Pancréas	Différence	Testicules	Différence	Muscles	Différence	OBSERVATIONS
	78.88		75.35		77.21		83.21		78.18		
— 0.78	79.21	— 0.33	72.61	+ 2.74	77.06	+ 0.15	83.11	+ 0.10	78.98	— 0.80	
	79.34		—		78.10		87.23		77.53		Hémorragies dans le rein et le pancréas.
+ 3.59	78.98	+ 0.36	—	—	74.17	+ 3.93	86.84	+ 0.39	78.20	— 0.67	
	80.46		74.28		78.27		84.97		77.38		
+ 0.11	78.79	+ 1.67	72.52	+ 1.76	75.03	+ 3.24	86.69	— 1.72	79.60	— 2.22	
	80.47		73.85		73.46		82.84		78.47		Le foie et le cerveau congestionnés.
+ 0.13	80.05	+ 0.42	72.44	+ 1.41	75.75	— 2.29	86.33	— 3.49	79.54	— 1.07	
	76.56		75.14		77.38		—		78.48		
+ 1.66	77.55	— 0.99	72.50	+ 2.64	74.41	+ 2.97	86.35	—	78.13	+ 0.35	
	80.59		74.93		78.04		85.37		79.37		
— 0.05	78.89	+ 1.70	73.90	+ 1.03	77.70	+ 0.34	84.70	+ 0.67	79.44	— 0.07	
			75.75		—		84.30		—		
— 1.02	78.21	—	73.21	+ 2.54	—	—	86.84	— 2.54	79.44	—	
	80.95		75.02		77.83		—		76.53		
+ 1.22	77.92	+ 3.03	73.32	+ 1.70	—	—	86.68	—	79.00	— 2.47	
	80.90		76.95		77.75		—		76.00		Le foie congestionné.
—	80.00	+ 0.90	72.48	+ 4.47	—	—	85.24	—	77.51	— 1.51	
	78.37		77.41		78.84		87.23		76.81		Le cerveau et le pancreas congestionnés.
+ 4.20	79.77	— 1.40	73.50	+ 3.91	—	—	86.55	+ 0.68	78.09	— 1.28	Le cerveau congestionné.
	80.00		76.47		78.34		86.59		77.64		
— 0.67	—	—	72.35	+ 4.12	75.72	+ 2.62	86.80	— 0.21	78.61	+ 0.97	
	78.19		73.00		78.65		86.55		76.08		
+ 3.09	77.74	+ 0.45	71.85	+ 1.15	74.24	+ 4.41	86.25	+ 0.30	78.09	— 2.01	

Magnus Levi (1), Eppinger (2), Molnar (3), ainsi que les observations de Florion (4), Sărăcăceanu (5), etc., établissent l'action diurétique de la glande thyroïde. Or, les muscles représentent la grande réserve de l'eau de l'organisme. On pourrait donc attendre, *a priori*, une diminution de l'eau musculaire sous l'influence du traitement thyroïdien.

Mais, en ce qui concerne l'augmentation de l'eau hépatique, pancréatique, thymique, on doit penser plutôt à l'action stimulante que la glande thyroïde exerce sur ces organes.

C'est ainsi que Kojima (6), Fremieu et Dragoiu (7) ont observé des phénomènes cariokynétiques dans les cellules de ces organes sous l'influence du traitement thyroïdien. A son tour, Utterström (8) observa que le traitement thyroïdien à des doses appropriées stimule le développement du thymus.

On peut supposer que le traitement thyroïdien, en stimulant l'activité cellulaire de ces organes, y favorise d'abord les phénomènes de desintégration, et par ce mécanisme la concentration molléculaire, d'où la retention de l'eau.

En laissant de côté toute interprétation, il est intéressant de remarquer que l'augmentation de l'eau de ces organes et les phénomènes d'hyperplasie, de division cellulaire, marchent de pair. On peut y voir une action rajeunissante due au traitement thyroïdien.

En ce qui concerne le corps thyroïde lui-même, le traitement thyroïdien (comme l'iode) y augmente la quantité de colloïde et vraisemblablement, par ce mécanisme, aussi la richesse en eau.

Nous passons maintenant à l'hypophyse. Les rapports plusieurs fois invoqués entre le diabète insipide et les altérations hypophysaires, et les effets si nets du traitement de ce syndrome par les

(1) Magnus Levi in *Handbuch der Pathologie des Stoffwechsel* de von Noorden, 1906.

(2) Eppinger : « Zur Œdemfrage » (*Wiener kl. Woch.*, p. 863, 1916 et 1917, avec Steiner).

(3) Molnar : « Bechandlung der Œdeme mit Thyreoideapräparaten » (*Orvosi hetilap*, 64, n° 35, pp. 350-353, 1920. Analysé in *Kongress Zentrablatt fur die gesamte innere Med.*, etc., XV, 1, p. 45, 1920).

(4) Florian : *Contributiuni la Studiul opoterapiei tiroïdiene*, thèse de Bucarest, 1905.

(5) Saracaceanu : *Tratamentul tiroidian al œdemelor*, thèse de Jassy, 1926.

(6) Kojima : « Preliminary communication on the effects of thyroid feeding upon the pancreas » (*Pr. R. Soc. od Edinburg*, 36, n° 15, 1915-1916).

(7) Fremieu et Dragoiu : *C. R. Soc. Biologie*, 1921.

(8) Utterström : — « Contribution à l'étude des effets de l'hyperthyroïdisation spécialement en ce qui concerne le thymus » (*Archives de Méd. expér.*, vol. 22, p. 550, 1910).

extraits infundibulaires rendent cette étude particulièrement intéressante.

Nous n'avons étudié jusqu'à présent que l'action de l'extrait de lobe postérieur d'hypophyse. Nous avons employé à cet effet le Pituglandol Roche, dont l'action sur le diabète insipide est incontestable, ainsi que nous avons pu nous en convaincre par notre propre expérience.

Le tableau III résume l'ensemble de nos résultats. Nous avons fait chaque jour des injections d'un cinquième à un quart d'ampoule de Pituglandol. Le nombre d'injections varia entre cinq et trente-neuf. La quantité totale du produit injecté à chaque animal a varié d'une à huit ampoules.

En ce qui concerne les muscles, nous n'avons pas trouvé une influence importante et digne d'être signalée pour le moment. Il en fut de même pour le cerveau, le thymus, le foie. Pour la glande thyroïde, nous avons trouvé une différence en moins de 1,56 et de 0,43 chez deux des animaux ayant reçu respectivement cinq et dix injections de Pituglandol. Chez les animaux ayant reçu des injections pendant un plus grand nombre de jours, la thyroïde fut trouvée constamment plus riche en eau. Les différences procentuelles, en général inférieures à l'unité, s'élevèrent à 1,74 et 1,35 chez deux animaux ayant reçu respectivement dix-huit et trente-huit injections.

La teneur en eau des surrénales, inférieure chez deux animaux ayant reçu seulement cinq injections (différence en moins de 0,10 % dans un cas, de 1,11 % dans le second), était augmentée chez les animaux ayant reçu un plus grand nombre d'injections. La différence en plus oscilla entre 0,74 et 2,24 %. Ce dernier chiffre fut trouvé chez un cobaye pour lequel les injections avaient été répétées pendant trente-huit jours. L'eau des surrénales fut déterminée chez huit animaux injectés et chez un nombre égal de témoins.

Nous ne possédons pas, jusqu'à présent, assez de dosages en ce qui concerne les ovaires ou les testicules. Pour le pancréas, sur les six dosages que nous avons pratiqués, on trouve une seule fois une moindre quantité d'eau (différence de 1,76 %) chez l'animal injecté (pendant cinq jours). Chez cinq autres animaux qui reçurent un plus grand nombre d'injections, la teneur en eau se montra augmentée, la différence maxima (3,14 %) étant obtenue chez un animal qui avait reçu des injections pendant vingt-huit jours. Chez les quatre autres, les différences en plus varièrent entre 0,94 et 2,12.

TABLEAU III

Nos des paires	COBAYE	L'âge de l'animal	Combien de jours il a été fait des injections	La quantité totale de "Pituglandol" injectée	Poids en grammes		*Cerveau*	Différence	*Thyroïde*	Différence	*Thymus*	Différence	*Foie*
					Initial	Final							
1	f. injectée	2 mois	5 jours	0.5 c.c.	188	195	81.02		72.11		76.90		71.71
1′	f. témoin	2 mois	—	—	176	224	82.24	−1.22	73.67	+1.56	79.15	−2.25	74.45
2	m. injecté	1 mois 20 jours	5 jours	0.5 c.c.	133	135	80.54		—		80.30		72.41
2′	m. témoin	1 mois 20 jours	—	—	158	—	80.54	−0.10	73.80		80.87	−0.57	70.41
3	m. injecté	1 mois 29 jours	10 jours	1.1 c.c.	162	216	—		75.17		78.82		73.34
3′	m. témoin	1 mois 29 jours	—	—	177	236	80.65		75.60	+0.43	77.80	+1.02	73.96
4	m. injecté	2 mois 18 jours	16 jours	2.2 c.c.	229	—	80.00		74.04		79.47		73.23
4′	m. témoin	2 mois 18 jours	—	—	272	391	80.59	+0.59	72.30	+1.74	75.82	+3.65	72.91
5	f. injectée	2 mois	20 jours	2.5 c.c.	238	297	80.94		75.17		76.73		75.09
5′	f. témoin	2 mois	—	—	282	319	80.83	−0.11	74.91	+0.26	78.62	−1.89	74.84
6	f. injectée	1 mois 21 jours	28 jours	4.1 c.c.	209	259	80.55		73.99		78.98		74.63
6′	f. témoin	1 mois 21 jours	—	—	157	253	80.11	+0.44	73.34	+0.65	77.41	+1.57	72.55
7	m. injecté	2 mois 20 jours	37 jours	5.5 c.c.	195	297	80.22		73.73		79.31		71.76
7′	m. témoin	2 mois 20 jours	—	—	—	—	80.14	+0.08	73.43	+0.30	78.84	+0.47	74.28
8	f. injectée	3 mois 8 jours	38 jours	5.8 c.c.	253	331.5	79.20		74.04		76.50		73.80
8′	f. témoin	3 mois 8 jours	—	—	231	401	79.60	−0.40	73.73	+0 31	79.35	−2.85	72.20
9	f. injectée	2 mois 9 jours	38 jours	5.8 c.c.	275	363	79.80		75.54		77.94		72.01
9′	f. témoin	2 mois 9 jours	—	—	270	440	79.48	+0.32	74.19	+1.35	76.78	+0.16	73.71
10	m. injecté	3 mois 17 jours	39 jours	—	301	416	79.72		75.36		78.39		72.08
10′	m. témoin	3 mois 17 jours	—	—	273.5	391	79.96	−0.24	74.82	+0.54	77.76	+0.63	71.14

Abréviations : m., mâle ; — f., femelle.

Différence	*Rein*	Différence	*Surrénales*	Différence	*Pancréas*	Différence	*Testicule*	Différence	*Ovaire*	Différence	*Muscles*	Différence	Observations
	78.84		68.63		76.35		—		84.32		79.64		L'utérus et les trompes utérines congestionnés et augmentés de volume.
−2.74	78.97	−0.13	68.73	−0.10	78.11	−1.76	—		84.88	−0.56	80.90	−1.36	
	—		70.00		—		83.17		—		78.80		
+2.00	80.08		71.11	−1.11	77.61		85.10	−1.93	—		80.25	−1.45	
	78.41		70.86		78.88		83.34		—		81.07		
−0.62	77.80	+0.61	70.00	+0.86	—		85.85	−2.51			80.10	+0.97	
	79.40		69.26		78.31		84.46				78.71		
+0.32	78.34	+1.06	—		77.34	+0.97	—		—		79.19	−0.48	
	78.97		68.50		78.35		—		83.61		79.69		L'urérus et les trompes utérines congestionnés et augmentés de volume.
+0.25	78.99	−0.02	—		76.23	+2.12	—		84.16	−0.55	79.56	+0.13	
	81.20		68.54		78.19						79.85		
+2.08	79.08	+2.12	67.13	+1.41	75.05	+3.14	—		—		79.14	+0.71	
	77.93		69.24		75.70		85.14				79.75		
−2.52	76.80	+1.13	67.00	+2.24	76.33	−0.63	86.45	−1.31	—		—		
	78.66		67.29		76.54		—		80.00		79.50		L'utérus et les trompes utérines congestionnés et augmentés de volume.
+1.60	77.83	+0.83	66.55	+0.74	75.65	+0.89	—		83.33	−3.33	79.00	+0.50	Gravide (2e - 3e sem.)
	79.24		69.06		77.88						79.20		
−1.70	79.31	−0.07	68.15	+0.91	76.31	+1.57	—		82.32	—	78.84	+0.36	Gravide (2e - 3e sem.)
	79.72		69.34		74.48		86.68		—		79.26		
+0.94	79.78	−0.06	68.01	+1.33	73.54	+0.94	86.96	−0.28	—	—	78.21	+1.05	

Pour les reins, sur les neuf dosages que nous possédons, nous avons trouvé quatre fois une quantité d'eau plus faible chez les animaux injectés. Mais la différence fut peu importante : 0,13 chez l'animal qui reçut cinq injections ; 0,02, 0,07 et 0,06 chez trois autres ayant reçu respectivement dix, trente-huit et trente-neuf injections. Chez les cinq autres animaux injectés, on trouva, par contre, une augmentation de l'eau, dont le maximum (différence de 2,12 en plus) fut atteint chez un animal injecté pendant vingt-huit jours.

Dans la littérature médicale, nous trouvons à citer les recherches de Brunn (1) et celles de Biasotti (2), qui ont vu que l'injection d'extrait postérieur d'hypophyse chez les grenouilles est suivi rapidement d'une augmentation pondérale due à la rétention de l'eau. Les muscles des grenouilles « gonflées » sont pâles et œdémateux.

D'autres expériences ont eu en vue l'action de l'insuline sur l'hydratation des organes et tissus.

L'ensemble des résultats se trouve condensé *dans le tableau IV.*

Nos expériences ont porté sur des jeunes cobayes (au-dessous de quatre mois). Les témoins et les animaux injectés étaient choisis sensiblement d'âge et de poids assez rapprochés.

Nous nous sommes servis de l'insuline Toronto ou Welcome, procurée dans le commerce pharmaceutique.

La dose quotidienne fut d'une demi-unité en injection sous-cutanée. Les animaux furent sacrifiés après cinq à trente-huit injections, et le plus souvent deux heures à trois heures et demie après la dernière injection.

L'action de l'insuline a varié avec l'organe examiné.

Pour certains organes tels que le foie et le pancréas, on trouva dans la plupart des cas les glandes des animaux traités moins riches en eau que celles des témoins; pour le thymus, on trouve le même nombre de glandes plus et moins hydratées chez les injectés et chez les témoins.

Les différences en faveur des animaux injectés varièrent pour le foie entre 0,87 et 0,96 %. Celles au détriment des animaux traités, entre 0,19-1,82 %.

Pour le thymus, les mêmes différences furent respectivement de 0,86 à 1,09 et de 0,27 à 1,78.

(1) Brunn : « *Zeitschr. f. exp. Med.*, 1921, XXV, p. 17.

(2) Biasotti : « Influence de l'extrait d'hypophyse sur l'imbibition des tissus » (*C. R. Soc. Biol.*, LXXXVIII, n° 5, p. 61, 1923).

Pour la thyroïde, ces mêmes différences oscillèrent entre 0,17 et 2,60 d'une part ; 0,18 et 3,63 de l'autre.

Les muscles furent trouvés constamment moins riches en eau chez les animaux injectés que chez les témoins. Les différences à l'avantage des témoins ont varié entre 0,20 et 2,56.

Pour le pancréas, on trouva trois fois une plus grande teneur en eau chez les injectés et cinq fois chez les témoins. Les premières différences furent de 0,06 et 2,95 ; les secondes varièrent entre 0,51 et 2,39.

Sur les quatre dosages de l'eau des testicules, une seule fois la teneur en eau fut supérieure (de 0,97 %) chez l'animal injecté. Dans les trois autres cas, elle fut inférieure (différences de 0.11 à 0,21 %) chez les témoins.

Sur les neuf dosages de l'eau des capsules surrénales, on trouva quatre fois une plus grande quantité chez les injectés (différence de 0,28 et 2,40 %). Dans les six autres cas, les glandes des témoins étaient, par contre, plus riches en eau (différences de 0,68 à 2,05).

Pour le cerveau, le nombre de cas dans lesquels cet organe était plus riche en eau chez les animaux ayant reçu de l'insuline que chez les témoins fut plus grand que celui de ces derniers, le rapport étant de 7 à 3. Les différences en plus chez les animaux traités oscillèrent respectivement entre 0,03 et 3,33.

Les variations en moins chez les cobayes injectés ont oscillé entre 0,02 et 0,58.

Pour le rein, on trouva quatre fois l'organe plus (0,21 à 1,01) et autant de fois moins riche en eau (de 0,04 à 0,69) chez les animaux injectés que chez les témoins. Les ovaires furent trouvés deux fois moins riches en eau (0,70 et 2,79) et une fois plus hydratés (1,11) chez les animaux injectés.

Nous avons étudié ensuite la teneur en eau des organes et du tissu musculaire chez les animaux châtrés. L'ensemble de ces expériences se trouve condensé dans le *tableau V*.

De l'examen de ce tableau, il résulte ce qui suit : sur onze examens des muscles, on trouva six fois la teneur en eau diminuée chez les animaux châtrés et cinq fois, par contre, augmentée. Les différences en plus oscillèrent entre 0,15 et 1,32, celles en moins entre 0,85 et 2,15.

Il semblerait, au premier examen, que l'action de la castration a été nulle au point de vue que nous étudions.

Pourtant, à regarder de plus près, il se dégage un fait sur lequel il convient d'attirer l'attention.

TABLEAU IV

Numéros	COBAYE	Age de l'animal	Combien d'unités d'insuline il a reçues	Nombre de jours d'injection	Le temps écoulé entre la dernière injection et le sacrifice de l'animal	Poids en grammes		Cerveau	Différence	Thyroïde	Différence	Thymus
						Initial	Final					
1	M. injecté.....	1 mois, 12 jours	2.5	5	2 h. 30′	200	205	80.15	—	76.84	—	77.25
1′	Témoin	1 mois, 12 jours	—	-	—	220	210	80.01	+0.14	76.67	+0.17	76.36
2	M. injecté.....	1 mois, 22 jours	5	10	2 h. 30′	202	185	81.18	—	75.40	—	77.65
2′	Témoin	1 mois, 22 jours	—	—	—	202	226	80.05	+1.13	74.01	+1.39	76.79
3	M. injecté.....	3 mois, 9 jours	5	10	2 h. 30′	250	240	80.01	—	74.15	—	80.29
3′	Témoin	3 mois, 9 jours	—	—	—	274	322	80.03	−0.02	75.68	−1.53	79.20
4	F. injectée	1 mois	6.5	13	3 h.	216	216	83.29	—	72.03	—	77.54
4′	Témoin.....	1 mois	—	-	—	203	279	79.86	+3.33	72.21	−0.18	77.23
5	M. injecté.....	23 jours	7	14	2 h.	146	157	80.50	—	70.71	—	78.97
5′	Témoin	23 jours	—	—	—	125	200	80.10	+0.40	74.34	−3.63	—
6	M. injecté.....	1 mois, 2 jours	8.5	17	2 h.	200	235	80.33	—	72.87	—	75.41
6′	Témoin	1 mois, 2 jours	—	—	—	172	233	80.01	+0.32	73.37	+0.50	76.83
7	M. injecté.....	1 mois, 6 jours	17.5	22	14 h.	150	206	80.02	—	75.17	—	80.03
7′	Témoin	1 mois, 6 jours	—	—	—	140	209	80.28	−0.26	73.47	+1.70	—
8	F. injectée	2 mois, 16 jours	14.5	29	3 h. 30′	212	273	80.31	—	71.95	—	76.90
8′	Témoin	2 mois, 16 jours	—	—	—	215	306	80.10	+0.21	71.51	+0.44	78.65
9	F. injectée	3 mois	19	38	2 h. 30′	256	326	79.77	—	76.35	—	76.78
9′	Témoin	3 mois	—	—	—	215	310	80.35	−0.58	73.75	+2.60	77.05
10	F. injectée	3 mois	19	38	2 h. 40′	205	274	80.07	—	75.05	—	77.22
10′	Témoin	3 mois	19	—	—	—	339	80.31	+0.03	—	—	79.00

Différence	Foie	Différence	Rein	Différence	Pancréas	Différence	Surrénales	Différence	Testicules	Différence	Ovaire	Différence	Muscles	Différence
—	72.13		79.13		76.96		69.15		—		83.42		79.26	
+0.89	73.95	—1.82	79.24	—0.11	77.75	—0.79	70.83	—0.68	—	—	84.12	—0.70	79.61	—0.35
—	75.04		79.59		79.14		72.31		85.32		—		76.95	
+0.86	75.58	—0.54	78.58	+1.01	80.08	—0.94	70.15	+2.16	84.35	+0.97	—	—	79.51	—2.56
	73.42		78.56		76.83		70.86		85.87		—		76.98	
+1.09	73.73	—0.31	78.60	—0.04	76.77	+0.06	69.58	+0.28	86.19	—0.32	—	—	78.74	—1.76
	73.44		77.57		75.31		66.79		—		84.17		80.33	
+0.31	72.57	+0.87	77.81	—0.24	77.70	—2.39	68.84	—2.05	—	—	83.06	+1.11		
	72.13		80.06		76.69		73.01		83.22		—		79.04	
—	73.95	—1.82	79.85	+0.21	—	—	70.61	+2.40	83.33	—0.11	—	—	80.30	—1.26
	73.92				77.14		69.15		—		—		79.12	
—1.42	74.07	—0.15			78.66	—1.52	70.83	—0.68	—	—	—	—	79.69	—0.57
	73.15		79.04		79.34		69.91		82.45		—		80.36	
—	73.45	—0.30	79.73	—0.69	79.85	—0.51	70.78	—0.77	83.66	—1.21	—	—	80.94	0.58
	74.50		78.51		74.74		65.54		—		82.54		79.16	
—1.75	73.54	+0.96	78.10	+0.41	—	—	67.07	—1.53	—	—	85.33	—2.79	79.36	—0.20
	73.10		77.69		79.34		66.31		—		84.17			
—0.27	73.29	—0.19	77.40	+0.29	79.85	+0.51	65.47	+0.84	—	—	—	—	77.78	
	—		—		79.19		—		—		—		—	
—1.78	71.05	—	78.24	—	76.24	+2.95	68.26	—	—	—	—	—		

TABLEAU V

Numéros	COBAYE	Age de l'animal	Combien de temps s'est-il passé depuis l'opération ?	Poids		Cerveau	Différence	Hypophyse	Différence	Thyroïde
				Initial gr.	Final gr.					
1	Châtré.....	1 mois 1/2	1 mois		354	80.31		—		—
1′	Témoin.....	1 mois 1/2	—		354	79.86	+ 0.45	—	—	72.21
2	Châtré.....	2 mois (?)	1 mois		418	79.61		—		74.10
2′	Témoin.....	2 mois (?)	—		391	79.93	— 0.32	—	—	75.02
3	Châtré.....	1 mois 1/2	1 m., 5 j.		284	80.85		78.08		73.24
3′	Témoin.....	1 mois 1/2	—		207	80.28	+ 0.57	79.45	— 1.37	75.81
4	Châtré.....	6 m., 8 j.	2 m., 12 j.		440	79.87		—		75.74
4′	Témoin.....	6 m., 9 j.	—		504	79.76	+ 0.11	—	—	75.79
5	Châtré.....	6 mois	3 m., 11 j.		525	79.45		—		72.19
5′	Témoin.....	6 mois	—		435	79.34	+ 0.11	—	—	72.34
6	Châtré.....	23 mois	8 mois		985	77.90		—		74.29
6′	Témoin.....	23 m., 2 j.	—		960	77.98	— 0.08	—	—	74.32
7	Châtré.....	6 m., 15 j.	4 mois		525	80.51		—		70 00
7′	Témoin.....	6 m., 15 j.	—		485	80.69	— 0.18	79.45	—	—
8	Châtré.....	21 m., 15 j.	9 mois, 9 j.		821	78.32		78.23		72.31
8′	Témoin.....	21 m., 22 j.	—		867	79.71	— 1.39	78.60	— 0.37	72.85
9	Châtré.....	22 mois	9 mois		818	77.54		78.53		72.39
9′	Témoin.....	22 mois 1/2	—		844	77.01	+ 0.53	77.45	+ 1.08	74.36
10	Châtré.....	9 m., 20 j.	9 m., 15 j.		625	79.38		79.47		74.02
10′	Témoin.....	9 m., 20 j.	—		722	78.91	+ 0.47	78.98	+ 0.49	72.96
11	Châtré.....	14 mois	12 mois		1.810	78.18		—		71.20
11′	Témoin.....	14 mois	—		1.750	79.25	— 1.07	—	—	71.14

Différence	Thymus	Différence	Foie	Différence	Rein	Différence	Pancréas	Différence	Muscles	Différence	Surrénales	Différence
	77.42		75.37		78.33		76.96		79.06		67.27	
—	77.23	+ 0.19	75.00	+ 0.17	76.90	+ 1.43	—	—	78.58	+ 0.48	68.26	— 0.99
	76.82		74.52		76.32		73.37		78.46		70.13	
0.92	77.01	- 0.19	72.29	+ 2.23	77.80	— 1.48	74.34	- 0.97	77.82	+ 0.64	70.45	— 0.32
	—		73.57		79.61		77.68		79.76		68.24	
2.57	—	—	73.72	— 0.15	79.21	+ 0.40	77.70	— 0.02	78.45	+ 1.31	—	—
	77.49		70.86		77.74		—		79.04		71.87	
0.05	75.95	— 1.54	72.29	— 1.43	80.49	— 2.75	76.12	—	77.72	+ 1.32	68.31	+ 3.56
	77.15		73.84		78.53		75.11		77.83		70.45	
0.15	76.77	+ 0.38	74.39	— 0.55	78.29	+ 0.24	74.87	+ 0.24	77.68	+ 0.15	70.14	+ 0.31
	—		73.14		77.96		74.25		75.52		69.25	
0.03	77.72	—	73.24	— 0.10	77.76	+ 0.20	74.35	— 0.10	76.57	— 1.05	70.01	— 0.76
	—		73.39				74.07		74.74		69.91	
—	76.31	—	71.60	+ 1.79			74.06	+ 0.01	76.35	— 1.61	69.11	+ 0.80
	—		73.95		80.26		67.90		76.74		71.95	
0.54	—	—	74.56	— 0.61	80.28	— 0.02	69.63	— 1.73	78.05	— 1.31	70.09	+ 0.86
	70.25		70.57		78.40				76 85		71.03	
1.97	70.54	— 0.29	71.33	— 0.76	79.17	— 0.77	—	—	78.44	— 1.59	70.14	+ 0.89
	70.94		71.93		78.83		72.81		77.43		68.09	
1.06	75.11	— 4.17	71.50	+ 0.43	76.92	+ 1.91	—	—	78.28	— 0.85	66.06	+ 2.03
	74.13		73.25		77.39		75.43		74.33		70.02	
0.06	75.10	— 0.97	75.18	— 1.93	77.03	+ 0.36	76.13	— 0.70	76.48	— 2.15	69.13	+ 0.89

Tous les cas où les muscles furent plus riches en eau chez les animaux opérés concernent des interventions relativement récentes. A partir du quatrième mois, la teneur en eau fut constamment diminuée chez les animaux châtrés. Il semble donc qu'on peut conclure que la castration diminue l'eau des muscles, mais que cette diminution est précédée d'une phase où l'hydratation de ces organes est augmentée.

La diminution de l'eau musculaire chez les animaux châtrés est à rapprocher de celle qu'on observe chez les animaux hyperthyroïdisés. A ce point de vue encore, l'action du corps thyroïde et celle des testicules semble d'ordre antagoniste.

Sur les dix cas où la teneur en eau des capsules surrénales fut examinée, on en trouve sept où elle était augmentée chez les animaux châtrés et seulement trois où elle était diminuée. Les différences en plus oscillèrent entre 0,31 et 3,56, celles en moins entre 0,32 et 0,99.

Sur les trois cas où la teneur en eau fut diminuée chez les animaux châtrés, on en trouve deux où l'opération ne datait que d'un mois. Dans le troisième, l'examen eut lieu huit mois après l'intervention. Les sept cas où la teneur en eau fut trouvée augmentée dans les muscles des opérés concernent des cobayes châtrés depuis trois à douze mois. Ici encore, avec l'exception déjà citée, il semble qu'on peut conclure que l'ablation des testicules enrichit les surrénales en eau et que cette augmentation est précédée par une phase où a lieu une diminution.

L'augmentation en eau des surrénales après la castration est à rapprocher de l'hyperplasie de ces organes à la suite de cette même intervention observée par Teodossief (1).

Ce processus hyperplasique, qui va de pair avec une augmentation de l'hydratation de ces organes, suscite l'idée que la castration exerce sur les surrénales, au point de vue ilikibiologique, une action rajeunissante ; et il est assez curieux de rappeler à ce point de vue que, tandis que pour la plupart des organes on trouve pendant la vieillesse un processus atrophique, pour les surrénales on peut observer fréquemment leur hypertrophie, ainsi que cela résulte des observations de Sabrazès (2) et des nôtres (3).

(1) Teodossief : *Ruski Wratsch.*, pp. 135-136, 1906.

(2) Sabrazès et Husnot : « Hypertrophie avec adénomes enkystés multiples des surrénales des vieillards » (*C. R. Soc. Biol.*, p. 445, 1906) ; « Sénilité et hypertrophie de surrénales ». (*Revue franç. d'Endocrin.*, I, n° 1, 1923, pp. 31-40).

(3) Parhon et Kahane : « Observations histopathologiques sur les organes d'un vieux chien » (*C. R. Soc. Biologie*, XCI, p. 757).

Sur les sept examens du thymus, on trouve quatre fois une diminution oscillant entre 0,19 et 4,17, et trois fois une augmentation de l'eau (entre 0,19 et 1,54).

Sur les neuf examens de la thyroïde, nous avons trouvé deux fois une augmentation (de 1,06 et 0,06 %) et sept fois une diminution (oscillant entre 0,03 et 2,57 %).

Sur les onze examens du foie, nous avons trouvé quatre fois une augmentation et six fois une diminution de l'eau après la castration, l'augmentation oscillant entre 1,79 et 2,23, la diminution entre 0,10 et 1,93.

Sur les sept dosages de l'eau pancréatique, nous avons trouvé que la castration a été suivie deux fois d'une augmentation de 0,01 et 0,24 et cinq fois d'une diminution oscillant entre 0,02 et 1,73.

Sur les neuf examens du cerveau, nous avons trouvé cinq fois une augmentation (oscillant entre 0,11 et 0,57 %) et quatre fois une diminution (de 0,08 à 1,39 %).

Enfin, sur les dix examens des reins, nous avons trouvé six fois une augmentation de l'eau (de 0,20 à 1,43 %) et quatre fois une diminution oscillant entre 0,02 et 2,75 %).

Il est évident que ces recherches devront être poursuivies sur une plus grande échelle, en variant la dose de la substance, la durée de l'expérience, etc.

Il faudra, en outre, chercher à préciser si l'eau qui augmente ou diminue est intra ou extra-cellulaire, si elle est liée aux micelles colloïdales ou bien en dehors de ces dernières.

L'action d'autres glandes devra être également étudiée.

Nous nous proposons donc de continuer nos recherches avant d'établir des conclusions définitives (1).

Quoi qu'il en soit, un certain nombre de faits nous semblent se dégager déjà de nos recherches, savoir :

L'eau augmente dans le bout central des nerfs après leur solution de continuité.

Il en est de même pour celle des muscles énervés. Cette augmentation de l'eau des muscles énervés va de pair avec leur enrichissement en calcium.

Le traitement thyroïdien, à certaines doses et continué pendant un certain temps, détermine la diminution de l'eau des muscles.

Ce même traitement a, par contre, tendance à augmenter l'eau du foie, du pancréas, du thymus, du corps thyroïde et même du cerveau.

L'extrait du lobe postérieur de l'hypophyse a tendance à aug-

menter la teneur en eau du corps thyroïde, des surrénales et du pancréas.

L'insuline détermina la diminution de l'eau hépatique et musculaire et le plus souvent l'augmentation de l'eau pancréatique.

La castration, datant d'un certain temps, a été suivie d'une diminution de l'eau musculaire et d'une augmentation de celle des surrénales.

(Travail reçu à la Rédaction en juin 1926.)

MOUVEMENTS DU TRAIN POSTÉRIEUR PROVOQUÉS PAR L'EXCITATION DU BOUT PÉRIPHÉRIQUE DU VAGUE APRÈS SECTION DE LA MOELLE DORSALE

par

D. DANIELOPOLU et R. RADOVICI

(DEUXIÈME CLINIQUE MÉDICALE DE L'UNIVERSITÉ DE BUCAREST, HÔPITAL FILANTROPIA.)

Nous avons décrit dans plusieurs travaux antérieurs (1) les réflexes *viscéro-moteurs* et *oculo-viscéro-moteurs* dans les lésions interruptives de la moelle. Nous avons démontré, en effet, que :

1° Tant les muscles volontaires que les viscères dépendant du tronçon médullaire sous-lésionnel présentaient un état d'hypertonie interne ;

2° L'excitation d'un des viscères (vessie, côlon descendant) (distension, par exemple) déclanche des mouvements réflexes des membres inférieurs, phénomène que nous attribuons à un *réflexe viscéro-moteur* ;

3° La compression oculaire, qui ne produit aucun effet évident sur les muscles volontaires chez le sujet normal, provoquait chez cet individu, dont les viscères pelviens et les muscles des membres inférieurs étaient en état d'hypertonie, des mouvements de ces membres. Nous avons expliqué le phénomène par un réflexe *oculo-viscéro-moteur.*

Nous avons supposé que ce réflexe complexe est composé de plusieurs réflexes simples et superposés. La compression oculaire provoque d'abord la contraction des viscères innervés par le nerf vague (estomac, intestin grêle, etc.); la contraction de ces viscères déclanche à travers la moelle un nouveau réflexe qui provoque la contraction des viscères pelviens, laquelle à son tour produit un troisième réflexe, viscéro-moteur, par l'intermédiaire des cornes antérieures du tronçon médullaire sous-lésion-

(1) Soc. de Biologie, *Revue Neurologique*, Paris, 1922.

nel. Ajoutons encore que la contraction des viscères innervés par le vague déclanchait elle-même, et directement, un réflexe viscéro-moteur qui se manifestait par une contraction des muscles de la paroi abdominale. Nous renvoyons pour tous les détails de

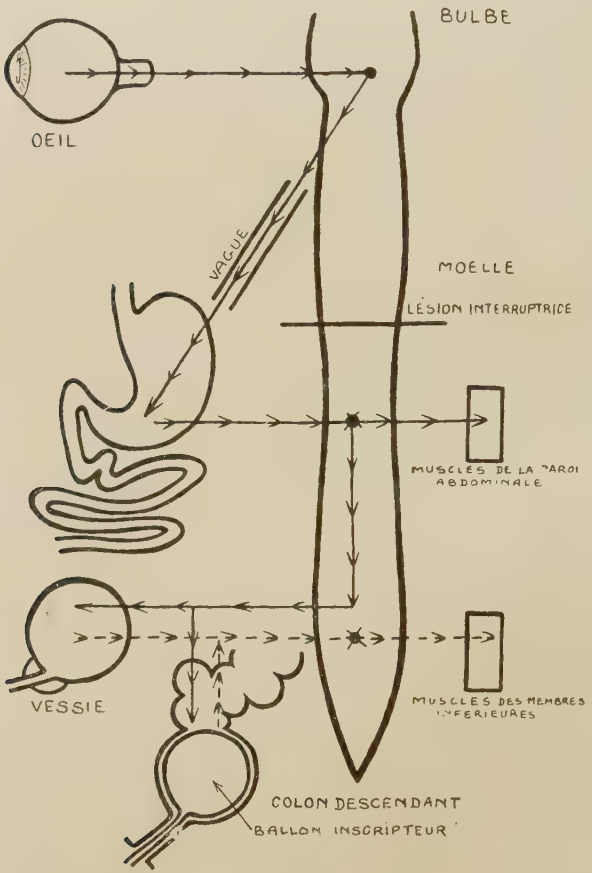


Fig. 1.

ces recherches à notre travail antérieur. Le schéma de la figure 1 aidera le lecteur à comprendre la voie de ces différents réflexes.

Désirant nous convaincre que notre manière de voir était exacte, nous avons entrepris deux ordres de recherches expérimentales, les premières sur l'homme, les secondes sur le chien.

A. Recherches sur l'homme.

La première fois que nous avons constaté que la compression oculaire produisait sur notre malade des mouvements des membres inférieurs, nous nous sommes demandé si ces réflexes ne se produisaient pas à travers la moelle, dont la lésion ne serait pas complètement interruptrice ; si, en d'autres mots, l'excitation venue des yeux comprimés ne se conduisait pas, le long de la moelle, jusqu'aux centres moteurs périphériques des muscles des membres inférieurs. L'examen clinique du malade, pour le détail duquel nous renvoyons à notre travail antérieur, rendait très peu probable cette supposition. L'interruption était quasi complète.

Mais une seconde expérience nous prouve que le réflexe oculo-viscéro-moteur se faisait à travers le pneumogastrique. Si, en effet, chez le même malade, l'on comprimait non pas les yeux, mais le pneumogastrique à la région cervicale, nous n'obtenions les mêmes phénomènes qu'après la compression oculaire.

Voici, détaillées, deux expériences qui, plusieurs fois répétées, nous ont constamment fourni les mêmes résultats :

Première expérience. — Nous faisons une compression du vague droit, d'une durée de quelques minutes, et nous nous assurons de son efficacité par le ralentissement du rythme et l'exagération de l'amplitude des mouvements respiratoires (1). Après un certain laps de temps, nous remarquons d'abord une contraction de la paroi abdominale. Très peu de temps après, le malade nous signale nettement l'envie d'uriner. Du côté des membres inférieurs, on ne remarque rien, ou à peine une légère contraction des muscles de la cuisse.

Deuxième expérience. — Nous introduisons dans le côlon une sonde terminée par un ballon en caoutchouc ; nous insufflons le ballon de façon à distendre moyennement le côlon et, à l'aide de la méthode d'inscription viscérale décrite dans nos travaux antérieurs (2), nous inscrivons les contractions du côlon. Nous comprimons alors le vague droit de la même manière que dans notre première expérience. Nous remarquons une série de phénomènes qui se suivent dans l'ordre suivant : d'abord *une contraction de la paroi abdominale,* ensuite *l'envie d'uriner et la contraction du côlon,* enfin une *contraction énergique des membres inférieurs, qui présentaient souvent le mouvement de triple rétraction.*

(1) Nous avons démontré antérieurement (*Réunion roumaine de Biologie,* juin 1924) que la compression du vague au cou produit chez l'homme une exagération considérable dans l'amplitude des mouvements respiratoires. Le phénomène se produit par voie réflexe et il est dû à l'excitation des filets centripètes contenus dans le vague.

(2) *Bulletin Soc. de Biologie,* 1922; — *Revue Neurologique,* 1922.

Il n'y avait aucun doute que le phénomène passait à travers le pneumogastrique. Mais comment expliquer la contraction des viscères pelviques et des muscles inférieurs, qui n'ont aucune relation avec le vague ? Nous expliquons le phénomène de la manière suivante : l'excitation du pneumogastrique produit la

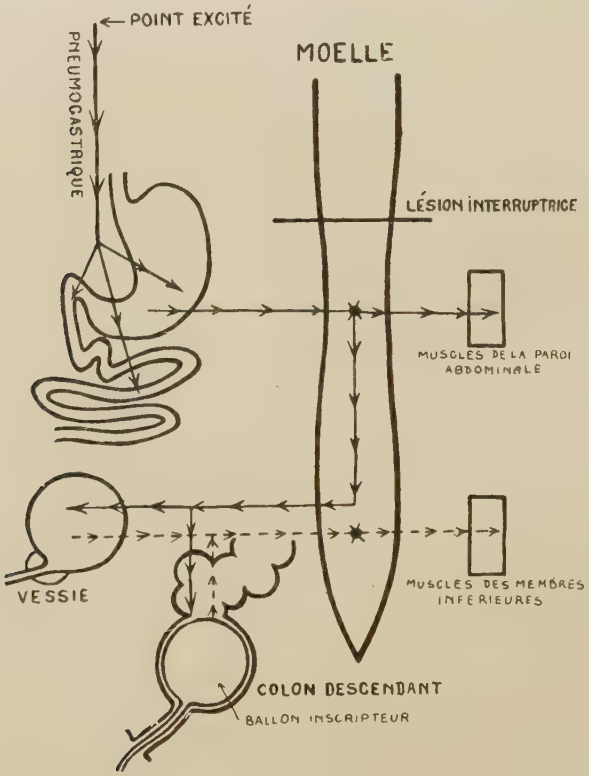


Fig. 2.

contraction des viscères innervés par ce nerf (estomac, intestin grêle, etc.). La contraction de ces viscères déclanche deux réflexes: un *réflexe viscéro-viscéral* qui, à travers les voies centripètes de ces viscères, la moelle et les centres parasympathiques sacrés, produit la contraction des viscères pelviques; un réflexe *viscéro-moteur* qui, à travers les voies centripètes des viscères innervés par le pneumogastrique et les cornes antérieures, produit la

contraction de la paroi abdominale. En dernier lieu, la contraction des viscères pelviques déclanche un second *réflexe viscéro-moteur,* qui, à travers les filets centripètes de ces viscères et les cornes antérieures de la moelle lombaire et sacrée, produit les mouvements dans les membres inférieurs.

Le schéma de la figure 2 rend mieux compte de la marche de ces réflexes.

Remarquons un fait important : dans la première expérience, où le ballon inscripteur n'était pas placé dans le côlon, l'excitation du vague ne produisait pas ce dernier réflexe, grâce auquel les muscles des membres inférieurs se contractaient. Il était, par conséquent, indispensable d'exciter la motilité des viscères pelviques pour que leur contraction déclanche le réflexe viscéro-moteur.

Cette interprétation fut confirmée par le fait qu'après l'injection d'atropine qui, paralysant le parasympathique, paralysait aussi les viscères pelviques, tous les réflexes viscéro-moteurs disparaissaient : on ne remarquait, en effet, après l'atropine, ni la contraction de la paroi abdominale, ni celle des muscles des membres inférieurs.

Nous avons cru indispensable, dans une nouvelle série de recherches, de nous convaincre par des recherches sur des animaux de la véracité de notre interprétation. Les résultats obtenus ont pleinement confirmé notre manière de voir.

B. Expériences sur les animaux.

Nous pratiquons le 16 juillet 1922, sur un chien de trois mois, la section de la moelle entre la dixième et la onzième paire dorsale. Paraplégie complète du train postérieur. Dix et onze jours après (le 26 et le 27 juillet 1922), nous faisons les expériences suivantes :

Première expérience

Excitation de la région sphinctérienne. — L'animal est couché sur le ventre; le train postérieur, complètement paralysé, pend au bord de la table d'opération.

Nous introduisons dans le rectum une sonde d'un gros calibre. Au moment où la sonde touche la région sphinctérienne, le train postérieur exécute douze à quinze mouvements rythmiques imitant la marche, d'une vitesse de deux à trois mouvements à la seconde. Nous répétons plusieurs fois l'expérience et nous obtenons les mêmes résultats.

Deuxième expérience

Excitation du côlon. — Nous introduisons à travers l'anus, dans le côlon ascendant, une sonde terminée par un ballon en caoutchouc, à 10-12 centimètres de profondeur à partir de l'anus. La simple introduction provoque au contact du sphincter les mouvements du train postérieur imitant la marche. Une fois la sonde introduite à la profondeur voulue, et laissée en place, les mouvements cessent et le train postérieur reste tranquille. Nous pratiquons alors la distension du côlon en insufflant la poire contenue dans cet organe. Il se produit à chaque insufflation un mouvement d'extension et d'adduction des membres postérieurs. C'est une contraction tonique des muscles, prolongée, quelquefois accompagnée de trépidations cloniques des deux membres. Pendant ce temps, la queue de l'animal se recourbe fortement en haut ou s'agite latéralement. Après la contraction suit une phase de relâchement. Tout rentre en ordre si nous dégonflons le ballon intracolique. Mais si nous maintenons le ballon gonflé, le même mouvement se répète plusieurs fois, entrecoupé par des phases de relâchement.

Tandis, par conséquent, que l'excitation de la région sphinctérienne provoque des mouvements rythmiques du train postérieur imitant la marche, l'excitation du côlon provoque une contraction tonique tout à fait différente.

Troisième expérience

Excitation du bout périphérique du vague droit. — Nous introduisons dans le côlon le ballon en caoutchouc et nous distendons l'organe. Nous sectionnons le vague droit et nous excitons son bout périphérique. Après une période latente assez grande, il se produit une contraction tonique intense des membres postérieurs; les membres présentent un mouvement d'extension prolongée très prononcé. En même temps, la queue s'agite latéralement. Ces mouvements sont identiques à ceux obtenus par la distension du côlon descendant.

Nous répétons l'expérience plusieurs fois avec les mêmes résultats. Remarquons pourtant que, si l'expérience était répétée à des intervalles de repos trop rapprochés, le phénomène ne se produisait plus. Pour que le résultat soit très évident, il faut qu'entre chaque excitation il s'écoule un certain intervalle de temps, assez long.

Dans une seconde expérience, nous excitons le bout périphérique du vague, sans que l'on distende préalablement le côlon descendant. Nous obtenons les mêmes mouvements dans le train postérieur, mais beaucoup moins intenses.

Quatrième expérience

Excitation du bout central du vague droit, le vague gauche étant intact. — Si nous excitons le bout central du vague droit, le vague gauche étant intact, nous reproduisons le phénomène produit par l'excitation du bout périphérique : contraction tonique des muscles du train postérieur provoquant l'attitude caractéristique des jambes

et de la queue. Mais la période de latence est plus grande qu'après l'excitation du bout périphérique.

L'expérience fut répétée plusieurs fois avec les mêmes résultats.

Cinquième expérience

Excitation du bout périphérique du vague gauche. — L'excitation du bout périphérique du vague gauche produit le même phénomène que celle du bout périphérique du vague droit.

Sixième expérience

Excitation du bout central du vague gauche, le vague droit étant coupé. — L'excitation du bout central du vague gauche, le vague droit étant sectionné, ne produit aucun phénomène du côté du train postérieur.

Septième expérience

Mêmes expériences que précédemment, en examinant les contractions des viscères abdominaux après laparotomie. — Nous avons cru intéressant d'observer la motilité des viscères abdominaux après l'excitation du vague et pendant la production des mouvements du train postérieur. Nous excitons le bout périphérique du vague gauche. Nous remarquons après l'excitation de violentes contractions d'abord de l'estomac et de l'intestin grêle, ensuite du côlon, enfin le mouvement d'extension des membres postérieurs et des mouvements latéraux de la queue.

L'excitation du bout central du vague, le vague opposé étant sectionné, ne produit aucun effet.

Résumé et conclusions.

Disons d'abord que l'interprétation des résultats obtenus sur les animaux s'applique parfaitement à ceux des recherches entreprises sur l'homme.

1° *L'excitation du bout périphérique du vague droit ou gauche provoque chez un animal dont la moelle dorsale est interrompue des mouvements du train postérieur.*

Le phénomène s'explique de la manière suivante. L'excitation du vague provoque la contraction des viscères innervés par ce nerf. La contraction de ces viscères déclanche, à travers la moelle, un réflexe viscéro-viscéral qui produit la contraction des viscères pelviques. La contraction de ces derniers déclanche, à travers les filets centripètes de ces viscères et les centres moteurs du tronçon inférieur de la moelle, la contraction des muscles du train postérieur.

Si l'on fait l'expérience en examinant la motilité des viscères abdominaux après laparotomie, l'on assiste à la production successive de ces phénomènes.

2° *L'excitation du bout central du vague, le vague opposé étant intact, provoque le même phénomène, après une période latente plus longue.*

L'excitation des filets centripètes du vague provoque d'une manière réflexe, à travers le bulbe et l'autre vague, la contraction des viscères innervés par ce nerf. La contraction de ces viscères déclanche ensuite celle des viscères pelviques, laquelle à son tour provoque le réflexe viscéro-moteur sus-indiqué.

3° *Pour que le phénomène se produise d'une manière nette, il faut que la contraction des viscères soit très intense; que le tonus du parasympathique soit très élevé.*

C'est là la raison pour laquelle normalement le réflexe viscéro-moteur ne se produit pas, et il faut exagérer le tonus parasymthique des viscères pelviques par la section de la moelle dorsale pour pouvoir le provoquer par l'excitation du vague. C'est pour la même raison que le phénomène était plus faible, ou même ne se produisait pas, si nous ne prenions pas la précaution de distendre un des viscères pelviques (le côlon descendant) et d'augmenter ainsi sa contractilité. C'est enfin de la même manière que s'explique le fait qu'après l'atropine, qui paralyse les viscères, le phénomène manquait aussi.

4° Remarquons le fait que l'excitation viscérale, provoquée soit directement par la distension du côlon, soit indirectement par l'excitation du vague, *provoque surtout des mouvements toniques* prolongés et moins de contractions cloniques. Par contre, l'excitation de la région sphinctérienne donne naissance à des mouvements rythmiques imitant parfaitement les mouvements de la marche. Il s'ajoute par conséquent, dans le premier cas, un élément tonique dans la contraction qui présente, selon nous, une certaine importance.

Il y a deux éléments dans la contraction du muscle volontaire : un *élément clonique* dépendant des cornes antérieures et un *élément tonique* dépendant des centres végétatifs médullaires. Ces derniers entretiennent le tonus musculaire et sont très probablement situés dans la corne latérale. Nous avons soutenu que le muscle volontaire présente, en dehors de son innervation cérébro-spinale, une innervation végétative, double et antagoniste; le parasympathique serait le nerf actif et le sympathique le nerf

inhibiteur (1). Le mouvement rythmique de la marche, déclanché par l'excitation de la région sphinctérienne, était le résultat d'un réflexe provoqué par l'excitation des fibres de la sensibilité cutanée. Le mouvement d'extension tonique des membres provoqués était le résultat d'un réflexe viscéro-moteur provoqué par l'excitation de la sensibilité viscérale. Le réflexe viscéro-moteur est en réalité plus complexe qu'il ne semble. Il est composé, selon nous, d'un réflexe *viscéro-moteur* proprement dit, s'exerçant par l'intermédiaire des centres moteurs des cornes antérieures et d'un réflexe *viscéro-myotonique* se produisant par l'intermédiaire des centres végétatifs du tonus musculaire.

5° Toutes ces recherches démontrent que l'interprétation du réflexe oculo-viscéro-moteur, telle que nous l'avons donnée dans nos travaux antérieurs, est exacte.

Il y a un seul point sur lequel on pouvait nous apporter une objection : pour que le réflexe oculo-viscéro-moteur se déclanche, il faut que les viscères innervés par le vague se contractent. Or, dans des recherches antérieures (2), nous avons démontré que le réflexe oculo-gastrique est inhibiteur. Une inhibition de l'estomac ne pourrait, par conséquent, pas déclancher les autres réflexes sous-jacents.

Mais, chez notre malade, il ne s'agissait pas d'un sujet normal. Nous avons démontré antérieurement que le réflexe oculo-gastrique, comme tout réflexe oculo-viscéral d'abord, se conduit par les deux voies, sympathique et parasympathique, et prédomine sur la voie inhibitrice (sympathique). Si la voie sympathique, qui est médullaire, est interrompue, le réflexe ne se conduit que sur la voie parasympathique (vague) et sera inversé: la compression oculaire provoquera une exagération de la contractilité gastrique. C'est ce que nous avons supposé dans notre cas, où la lésion, très étendue, intéressait une bonne partie de la moelle dorsale qui contient les voies sympathiques de l'estomac. Notre supposition fut pleinement confirmée par l'examen anatomo-pathologique de la moelle fait par MM. Marinesco et Draganesco, et qui démontre une destruction étendue de la moelle dorsale, sous la forme d'une syringomyélie.

(1) *Revue Neurologique* et *C. R. Soc. Biologie*, 1922.
(2) *Annales de Médecine*, 1922, et *Arch. des Mal. de l'appareil digestif*, 1924.

RACES DE MÉNINGOCOQUES ET SÉROTHÉRAPIE ANTIMÉNINGOCOCCIQUE EN ROUMANIE

par

I. NICOLAU

La méningite cérébro-spinale épidémique est une maladie endémique en Roumanie.

Elle sévit surtout dans la population des villes.

Chaque année, vers la fin de l'été, quelques rares cas apparaissent ; dans la deuxième moitié de l'automne, le nombre de cas augmente et cette augmentation s'accentue à mesure que la saison avance ; elle atteint son maximum de février à avril, puis diminue progressivement.

Pendant l'hiver 1922-1923 dans tout le pays, mais surtout à Bucarest, le nombre de malades de méningite cérébro-spinale a été beaucoup plus grand que d'habitude.

A cette occasion, nous avons pu étudier nombre de cas dans deux milieux différents, mais qui constituent les milieux « de choix » de la maladie : à l'hôpital des Enfants malades et à l'hôpital militaire « Regina Elisabetha ».

Une série d'observations que nous avons recueillies, concernant les races de méningocoques isolés et la sérothérapie antiméningococcique, font l'objet de l'article présent.

***

Le nombre total des cas observés a été de trente-cinq, qui se répartissent de la façon suivante :

Treize cas parmi les militaires ;

Vingt-deux cas chez des enfants.

La première question qui nous a préoccupé a été celle de voir laquelle, parmi les différentes techniques recommandées pour

l'isolement du méningocoque du liquide céphalo-rachidien, donne les meilleurs résultats.

C'est un fait mentionné par la majorité des auteurs qui se sont occupés de cette question que l'isolement du microbe n'est pas facile dans tous les cas, que quelquefois il devient difficile, voire même pour nombre de cas, impossible.

Sans entrer dans de plus longs détails, nous dirons qu'habituellement nous avons employé, pour l'isolement du méningocoque, l'ensemencement direct du liquide ou du culot de centrifugation dans des tubes à la gélose-ascite ou au milieu T. Nicolle gélosé. Toutes les fois que nous avons eu des doutes sur la stérilité ou la non-stérilité des récoltes, nous avons fait des ensemencements sur les mêmes milieux, mais coulés en boîtes Petri. Sur ces milieux, nous avons fait — très facilement — l'isolement de méningocoque dans vingt-neuf cas sur trente-cinq.

Pour les six autres cas, quoique dans quatre cas nous ayions trouvé le méningocoque dans l'examen microscopique fait du culot de centrifugation, nous n'avons pas réussi à isoler le microbe. Nous avons utilisé alors dans ces cas négatifs, parmi les différentes techniques recommandées, les suivantes : milieu T. Nicolle liquide, bouillon-ascite, bouillon à l'œuf (Besredka et Jupille), et le procédé de Tribondeau à la gélose-ascite dans boîte Petri.

Nous n'avons pas été plus heureux en utilisant ces techniques, puisque nous n'avons pas réussi à isoler le méningocoque, quoiqu'il s'agissait de cas qui présentaient les uns des microbes dans le frottis, les autres toute la phénoménologie clinique de la méningite cérébro-spinale épidémique, cas qui, en outre, ont bénéficié du traitement sérique.

D'ailleurs, en ce qui concerne l'emploi des milieux liquides pour l'isolement du méningocoque, nous avons pu nous convaincre, par des ensemencements faits en même temps sur milieux liquides et solides, qu'on obtient un nombre plus grand de résultats positifs sur les milieux solides.

Mais, même dans les cas positifs, le méningocoque ne pousse en abondance sur les milieux liquides que vers le troisième jour.

Ce fait constitue un point net d'infériorité vis-à-vis des milieux solides dans une maladie où il y a une importance majeure à faire un diagnostic précis dans un minimum de temps.

Mais, en dehors de cela, des expériences qui sont en cours, et qui confirment celles déjà anciennes de Flexner, montrent que dans les milieux liquides il y a toujours une prompte et active

autolyse qui peut expliquer et le développement tardif et les insuccès dans l'isolement.

Quant à la technique de Tribondeau, recommandée par Dopter, le petit nombre de cas dans lesquels nous l'avons utilisée ne nous donne pas le droit de formuler une juste appréciation. Toutefois, il faudra mentionner que dans les six cas dans lesquels nous n'avons pas réussi à cultiver les méningocoques sur les milieux habituels, ils n'ont, non plus, poussé sur le milieu et par la technique de Tribondeau.

En ce qui concerne la présence ou l'absence des méningocoques dans les frottis faits du culot de centrifugation, dans cinq cas nous n'avons pas trouvé le microbe dans un premier examen microscopique.

Dans tous ces cas, nous avons essayé la méthode pour la mobilisation des méningocoques recommandée par Sainton et Schulmann.

Comme on le sait, la méthode consiste à faire des examens microscopiques du culot de centrifugation vingt-quatre heures après l'injection d'une quantité de sérum antiméningococcique dans le canal rachidien.

Dans deux cas, nous n'avons pas trouvé par cette méthode le méningocoque, quoiqu'il s'agissait, comme nous l'avons déjà dit, de cas cliniques sûrs de méningite cérébro-spinale épidémique. *En somme, dans trente-trois cas sur trente-cinq de méningite cérébro-spinale épidémique, nous avons pu établir un diagnostic bactériologique. Dans vingt-neuf de ces cas, on a pu même isoler et cultiver le méningocoque. La méthode pour l'isolement du méningocoque qui nous a donné les meilleurs résultats a été l'ensemencement direct du liquide ou du culot de centrifugation sur des milieux solides* (gélose-ascite, milieu T. Nicolle gélosé).

*
**

Nous avons procédé à une identification des races de méningocoques que nous avons pu isoler.

C'est la première identification faite en Roumanie.

Il serait intéressant d'établir une distribution géographique des différents types de méningocoques isolés dans différents pays. Certes, il y a variation des types d'un épidémie à l'autre, toutefois il semble que, dans les différents pays, il y a toujours un ou deux types de méningocoques qu'on trouve habituellement, et d'autres types qu'on trouve très rarement ou pas du tout.

Les types les plus fréquents en France sont les types *A* et *B*, et plus rarement le type *C*. On ne trouve pas le type *D*, et le sérum antiméningococcique préparé à l'Institut Pasteur de Paris est un sérum trivalent *A*, *B*, *C*, etc. (Dopter).

En Angleterre, on trouve toujours les types *A et B* (I et II d'après la classification de Gordon et Muray).

En Danemark, Thomson et Wulff, ont trouvé une race qui n'entre dans aucune catégorie de Nicolle-Debains et Jouan.

Wadsworth, Ruth et Hutton, aux Etats-Unis d'Amérique, sur cinquante-trois sources examinées, trouvent :

6	sources, type	I	Gordon.
13	— —	II	—
24	— —	III	—
1	source, —	I, III	—
9	sources n'entrent dans aucune catégorie de Gordon.		

Prezesmycki trouve dans une épidémie, à Varsovie, en 1919-1920 :

85 % type *A*,

15 % type *B*.

Dans les cas observés par nous, nous avons fait l'identification par les épreuves courantes de l'agglutination et de la saturation des agglutinines.

Nous avons employé des sérums agglutinants anti *A*, *B*, *C* et *D*; comme témoins, quatre sources type *A*, *B*, *C* et *D* de l'Institut Pasteur de Paris.

Pour chaque identification, nous avons fait un contrôle par le sérum normal de cheval dans les mêmes dilutions que les sérums agglutinants.

Sur vingt-neuf sources examinées à ce point de vue, nous avons trouvé :

Le type	A	dans	70,7 %,
— —	B	—	25,0 %,
Le type	C	dans	0,0 %,
— —	D	—	4,3 %.

L'agglutination n'a pas été toujours nettement spécifique pour une source et un sérum donné ; pourtant, nous avons été obligé très rarement d'avoir recours à l'épreuve de la saturation des agglutinines (source Jolanda II, Rez. II).

Dans la très grande majorité des cas, nous avons eu une agglutination à titre nettement inférieur pour le sérum hétérologue et à un titre beaucoup plus grand pour le sérum homologue.

Voici quelques exemples :

La source	Jassy I.....	*A* 1/100e,	*B* 1/300e ;
—	— N... III.....	*A* 1/50e,	*B* 1/300e ;
—	— Istrati	*B* 1/50e,	*D* 1/200e ;
—	— N...	*A* 1/50e,	*D* 1/200e.

Un fait curieux observé est celui de la source N... III.

Cette source, isolée du liquide céphalo-rachidien avant l'injection du sérum antiméningococcique, était agglutinée exclusivement par le sérum anti *D* jusqu'à dilution à 1/300e.

Nous l'avons isolée de nouveau après l'injection du sérum antiméningococcique. Cette fois, la source, tout en restant agglutinable par le sérum anti *D* à la même dilution, devenait agglutinante encore pour le sérum anti *A* jusqu'à la dilution à 1/150e.

Nous avons répété plusieurs fois l'agglutination parallèlement avec les deux sources, et nous avons toujours obtenu le même résultat. Pour le moment, nous ne pouvons donner aucune explication à ce fait.

Il nous a semblé intéressant de rechercher le pouvoir fermentatif, pour les sucres, des treize sources des différents types.

Voici le tableau des résultats obtenus :

SOURCE	GLUCOSE	LEVULOSE	MALTOSE
1. A (Cornelia)	+ +	—	+ +
2. B (Pasteur)	—	—	+
3. B (Iassy 1)	+	—	+ +
4. B (Iassy 2)	+ +	—	+ +
5. B (N... 1)	+ +	—	+ +
6. C (Pasteur)	+ +	—	+ +
7. A (Tojocot)	—	—	+ +
8. A (Lcr)	+ +	—	+ +
9. A (N... V.)	—	—	+ +
10. A (Jolanda)	+	—	+ +
11. A (Turculet)	+	—	+ +
12. A (Istrati)	+	—	+ +
13. A (Preascã)			

On voit que la maltose est fermentée par toutes les sources presque au même degré d'intensité ; il y a des sources qui n'ont pas du tout fermenté la glucose (B. Pasteur, A. Tojocot, A. N...), d'autres l'ont fermentée un peu et d'autres enfin l'ont fermentée nettement.

D'après ce que nous avons observé, le pouvoir fermentatif des méningocoques pour les différents sucres ne peut pas être utilisé pour leur différenciation, ce qui est en concordance absolue avec

les recherches de tous les bactériologues qui se sont occupés de cette question.

En résumé, dans l'épidémie de méningite cérébro-spinale épidémique qui a sévi à Bucarest pendant l'hiver 1922-1923, le type prédominant de méningocoque a été le type A *(70.7 %) ; le type* B *(25.0 %) a été trouvé plus rarement ; le type* C *(0 %) n'a jamais été trouvé ; le type* D *dans 4.3 %.*

Le pouvoir fermentatif des méningocoques pour les différents sucres ne peut pas être utilisé pour leur différenciation.

*
**

Jusqu'en 1922, on traitait en Roumanie la méningite cérébro-spinale épidémique par des sérums antiméningococciques importés de l'étranger.

A cette date, on commence la préparation du sérum à l'Institut de séro-vaccins de Bucarest.

Pour des motifs d'opportunité (apparition de cas plus nombreux, absence de sérums frais de l'étranger, nécessité d'avoir rapidement la disposition du sérum antiméningococcique, etc.), nous avons commencé l'immunisation des chevaux par la méthode américaine d'H. Amoss et M. Wollstein.

Actuellement, dans la préparation du sérum antiméningococcique, nous procédons de la manière suivante :

Des méningocoques (trente-cinq races) des types *A, B, C et D,* en grande majorité isolés des cas de méningite du pays, sont ensemencés dans des tubes des dimensions habituelles 17 × 17 sur la gélose T. Nicolle, dont la réaction est à Ph = 7,8.

Après vingt-quatre heures d'étuve, les cultures — qui poussent très abondamment sur ce milieu — sont émulsionnées avec 2 centimètres cubes d'eau physiologique à 9 ‰ pour chaque tube.

On mélange les émulsions obtenues des cultures des différentes races. Pour l'immunisation des chevaux, on utilise la voie intraveineuse et on commence avec la dose de 0 cc. 1 d'émulsion épaisse, pour l'élever progressivement jusqu'à 0 cc. 6, qui représente la dose maxima qu'un cheval reçoit au cours de l'immunisation.

Dans les séries ultérieures, on répète la dose maxima, tout en introduisant à chaque série des sources nouvelles isolées.

La dose à injecter est toujours diluée dans un volume invariable de 15 centimètres cubes.

Les inoculations sont faites pendant trois jours de suite ; on

laisse un intervalle d'une semaine et on commence une nouvelle série d'inoculations.

Pour obtenir une immunisation complète, il faut en moyenne sept à huit séries.

Pour augmenter, diminuer ou répéter la même dose d'émulsion, on est guidé par la réaction thermique des chevaux.

A la quatrième heure après l'injection, on prend d'heure en heure la température de l'animal.

Si la température ne dépasse pas 40,5-41, et si dans les vingt-quatre heures elle est revenue à la normale, on augmente la dose, sinon on la répète ou on la diminue.

Deux semaines après la dernière série, on pratique la saignée.

On entretient l'immunisation des chevaux en leur faisant chaque mois une série de trois injections dans trois jours consécutifs avec les sources employées et les nouvelles sources qu'on a pu isoler.

D'après ce qui précède, on voit que nous avons apporté quelques petites modifications à la méthode originelle :

1° D'abord nous faisons les ensemencements sur la gélose T. Nicolle au lieu de gélose-sérum ; l'avantage du milieu de Nicolle, c'est que les cultures de vingt-quatre heures sont beaucoup plus abondantes que sur la gélose-sérum ;

2° Nous avons renoncé à faire des injections d'extraits microbiens pour préparer en même temps un sérum anti-endotoxique ; au point de vue thérapeutique, le sérum anti-endotoxique n'ajoute rien ou presque rien à sa qualité curative et il est encore périlleux pour les chevaux en préparation ;

3° Pour éviter les accidents anaphylactiques, *toujours à craindre,* nous préparons l'émulsion immédiatement avant d'être inoculée, puis nous filtrons sur une couche de gaze l'émulsion épaisse et encore une fois la dilution immédiatement avant d'être injectée ; enfin, tandis que dans les premières séries on injecte toute la quantité de dilution en une seule fois, dans les séries ultérieures on fait l'injection en trois reprises : 2 centimètres cubes à la première reprise ; 6 centimètres cubes à la deuxième (après quatre heures d'intervalle), et 7 centimètres cubes à la dernière reprise (après encore une heure).

En utilisant cette méthode, nous avons eu l'impression que les accidents sont très rares et d'importance minime (frisson, température au-dessus de 40° C., titubation, dyspnée, évacuation alvine; plus tard, des selles diarhéiques; très rarement des selles sanguinolentes). Jusqu'à présent, nous n'avons eu qu'un cheval

mort au cours de l'immunisation. Il s'agissait d'un vieil animal *(Cinos)*, qui présentait un médiocre état général, même au début de l'immunisation.

Ce cheval avait supporté onze séries d'injections. Deux jours après la dernière série, l'animal mourut subitement, en présentant des phénomènes convulsivants.

A la nécropsie, on a trouvé : une grande hémorragie dans la cavité abdominale, cirrhose et dégénérescence graisseuse hépatique, rupture du foie.

On fait le titrage du sérum par l'agglutination et la méthode de déviation.

Avec le sérum antiméningococcique, nous avons traité un nombre de :

13 militaires ;

13 enfants de un à quatorze ans ;

9 nourissons âgés de moins d'une année.

Nous avons utilisé la technique courante : injections intrarachidiennes dans la région lombaire ; injections dans la région dorsale ou cervicale, dans les méningites cloisonnées, enfin injections dans le ventricule latéral dans les cas de méningo-ventriculite.

Amoss et Eberson, ayant démontré que les injections sous-cutanées de sérum diminuent la rapidité de diffusion du sérum de la cavité rachidienne dans la circulation générale, nous avons aussi pratiqué dans chaque cas des injections sous-cutanées.

En principe, nous avons injecté dans chaque cas les plus grandes quantités de sérum que nous avons pu et que les circonstances permettaient.

Il n'entre pas dans notre intention de donner ici les observations cliniques complètes des cas traités ; nous nous contenterons de résumer en quelques courtes dates une série d'observations qui se rapportent à la manière dont on a appliqué et conduit le traitement et aux résultats obtenus dans nos cas.

Nous nous sommes guidé dans la conduite du traitement sérique presque exclusivement sur les résultats des examens cytobactériologiques du liquide céphalo-rachidien.

En général, on a continué les injections chaque jour tant que le liquide était trouble et qu'on trouvait sur les frottis, faits du culot de centrifugation, de nombreux leucocytes polynucléaires neutrophiles en grande majorité détruits et de fréquents méningocoques intra et surtout extra-cellulaires.

Dopter a attiré l'attention et a insisté sur le fait qu'il y a un

moment dans l'évolution de la maladie où il faut suspendre les injections de sérum.

Si l'on ne s'arrête pas, des phénomènes d'intolérance méningée se déclarent, phénomènes qui peuvent avoir les pires conséquences.

Nous osons être plus tranchant encore que Dopter. L'observation attentive et journalière de nos cas nous a donné la conviction que la chose la plus importante dans le traitement par le sérum n'est pas tant de savoir l'appliquer que de savoir le suspendre au moment opportun.

Nous sommes sûrs qu'une bonne partie des soi-disant insuccès de sérothérapie antiméningococcique sont dus à cette cause.

A quel moment doit-on alors suspendre les injections du sérum ?

Disons tout d'abord que l'examen clinique ne nous donne aucune réponse à cette question, ou donne des réponses trompeuses.

Sous l'influence du traitement, il peut arriver que les symptômes, au lieu de diminuer ou disparaître, s'accentuent.

Nous donnons ci-dessous une de nos observations qui est très démonstrative à ce point de vue.

Observation XV. — La fillette Y. G..., âgée de neuf ans, entre dans le service médical de l'hôpital des Enfants avec des symptômes très accentués de méningite cérébro-spinale épidémique. Etat général mauvais. On isole du liquide céphalo-rachidien un méningocoque de type *A*.

On fait cinq injections, pendant cinq jours consécutifs. La fièvre, la raideur de la nuque, le Kernig s'accentuent, l'état général devient très mauvais. On suspend le traitement sérique sur la foi des résultats des examens cytobactériologiques du liquide céphalo-rachidien, et on assiste à la disparition, comme par enchantement, de tous les symptômes en moins de vingt-quatre heures. Le surlendemain, la fillette lisait dans son abécédaire.

Nous avons donné cette observation, mais nous aurions pu donner presque toutes nos observations à l'appui de ce que nous venons d'affirmer.

Le moment précis où on doit suspendre les injections du sérum est indiqué par les examens cytobactériologiques du liquide céphalo-rachidien. On trouve alors dans le culot de centrifugation du liquide à peu près le tableau que nous donnons plus loin.

Le nombre des leucocytes polynucléaires neutrophiles a diminué et l'aspect de ces leucocytes est normal (peu ou pas d'alté-

ration nucléaire) ; apparition de leucocytes mononucléaires ; absence de méningocoques où l'on trouve encore de très rares microbes intracellulaires.

Dans le tableau ci-après, on peut voir que dans la grande majorité des cas un petit nombre d'injections de sérum ont été suffisantes pour amener la guérison définitive.

Nombre de cas	*Nombres des injections*
Dans 2 cas	2 injections consécutives
— 5 —	3 — —
— 9 —	4 — —
— 1 —	5 — —
— 5 —	6 — —
— 2 —	7 — —
— 1 —	9 — —
— 1 —	10 — —
— 3 —	plus de 10 — —

Dans trois cas, nous avons eu des rechutes d'un caractère bénin et qui ont cédé à deux ou trois nouvelles injections de sérum.

Résultats. — Sur un nombre total de trente-cinq cas, dont neuf nourrissons, nous avons eu six morts, donc un pourcentage de 17 %. La mortalité, pour les cas non traités, est en Roumanie de 64 % en moyenne.

Il serait téméraire d'établir une statistique sur un si petit nombre de cas.

Toutefois, on peut accepter provisoirement le chiffre de 17 % de mortalité comme un chiffre d'orientation pour juger de l'action curative du sérum.

Ce chiffre est de beaucoup plus favorable que celui des statistiques réunies par Flexner, qui trouve après le traitement sérique une mortalité de 31 à 33 %, de Schone avec 27 %, de Netter avec 28 %.

Notre chiffre se rapproche des chiffres donnés par Levy avec 18 à 29 % et Dopter avec 15,5 %.

Flexner, Dopter, Netter donnent comme chiffre de la mortalité chez les nourrissons, même après l'emploi de la sérothérapie, 48,6 à 50 %.

Nous sommes convaincu que cette grande mortalité tient à trois facteurs :

1° La forme méningo-ventriculaire est beaucoup plus fréquente à cet âge que plus tard ; 2° le cloisonnement se fait beaucoup plus facilement ; 3° on ne le faisait pas encore à la date où on a

établi les statistiques ci-dessus citées des injections intraventriculaires.

Les travaux récents, en établissant que le sérum antiméningococcique exerce son action curative seulement dans le cas où il est mis en contact immédiat avec la lésion anatomo-pathologique, et d'autre part les progrès réalisés dans la technique du traitement par les injections intraventriculaires, ont beaucoup contribué à diminuer la mortalité à cet âge.

La ponction ventriculaire est absolument inoffensive, et nous n'avons pas hésité à la pratiquer chaque fois que nous avons supposé une méningo-ventriculite chez les nourrissons.

Parmi nos neuf nourrissons, nous avons eu deux morts, ce qui ferait un pourcentage de 22,2 %, chiffre de beaucoup inférieur à celui qu'on trouve dans les traités classiques.

Le Gérant : J. CAROUJAT. NIORT. — IMPRIMERIE MARTIN.